

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین
دانشکده بهداشت

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد
رشته بهداشت و ایمنی مواد غذایی

عنوان:

ارزیابی ترکیبات شیمیایی، خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس گیاه *Thymus Kotschyanus* یا کهلیک اوتی در محیط آزمایشگاهی و مدل غذایی دوغ

استاد راهنما:

دکتر پیمان قجر بیگی

اساتید مشاور:

دکتر رزاق محمودی

دکتر اصغر محمدپوراصل

نگارش

فواد محمودزاده

آبان - ۱۳۹۳

ای پدر از تو هر چه می گویم باز هم کم می آورم

خوشیدی شدی و از روشنائی ات جان گرفتم و در ناامیدی ماندم را
کشیدی و بسیریزم کردی از شوق، اکنون حاصل دستان خسته ات رزم و فیتتم شد
به خودم تبریک می گویم که تو را دارم و دنیا با همه بزرگیش مثل تو را ندارد.....

و تو ای مادر، ای شوق زیبائی نفس کشیدن

ای روح مهربان، هستی ام تو رنگ شادی بایم شادی و لحظه ها را با تمام وجود از من دور کردی و عمری محنتی را با جان خریدی تا اکنون

توانستی طعم خوش پیروزی را به من بچشانی...

و خواهر و برادر عزیزم که همراهان همیشگی و پشتوانه های زندگیم بودن.

و همه کسانی که لحظه ای بعد انسانی و وجدانی خود را فراموش نمی کنند و بر آستان گران سنگ انسانیت سرفرودمی آورند و انسان را با همه

تفاوت هایش ارج می نهند...

شکر و قدردانی

به مصداق «من لم یسکر المخلوق لم یسکر الخالق» تقدیر و شکر شایسته از استاد فریخته و فرزانه آقای دکتر پیمان قهریگی که همواره راهنما و راه‌گشای اینجانب در مراحل مختلف تحصیل و انجام پایان نامه بودند.

جناب آقای دکتر رزاق محمودی استاد مشاور ارجمند که با ایجاد عشق به تحقیق و نوشتن، صبورانه، با ارایه‌ی راهنموده، انتقاد و پیشنهادهاشان، در تمامی مراحل اجرای پایان نامه مراحمیت و تشویق نمودند.

جناب آقای دکتر اصغر محمدپور اصل استاد مشاور محترم که با نظرهای اصلاحی ارزنده‌ی خود، ضمن دگرگونی بنده، موجب تکمیل این اثر شدند. از استادان محترم سرکار خانم دکتر مریم جوادی و آقایان دکتر غلام رضا جاهد، دکتر ساسان رضایی، دکتر محمد حسن عزیزی، دکتر مصطفی نوروزی، دکتر هدایت اله حسینی و تمامی عزیزانی که در طول دوران تحصیلی ام در دوره‌ی کارشناسی ارشد، جهت آموزش و ارتقای علمی بنده، زحمت کشیده اند سپاسگزارم.

از ریاست محترم تحصیلات تکمیلی، اساتید و کارکنان معاونت پژوهشی دانشکده بهداشت و مسئولین آزمایشگاه معاونت غذا و دارو استان قزوین و کلیه عزیزانی که در طول دوره کارشناسی ارشد از کمک و مساعدت‌های آن بهره‌مند شده‌ام، سپاسگزارم.

از جناب آقای اسدی مسئول آزمایشگاه محترم گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز نهایت شکر و قدردانی را دارم.

چکیده:

زمینه: اسانس ها و عصاره های حاصل از گیاهان دارویی با داشتن ترکیبات ضد میکروبی، ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی به عنوان ترکیبات دارویی جدید و طبیعی چه در زمینه بهداشت و درمان بیماری ها و چه محافظت از غذاهای خام و فرآوری شده از اهمیت خاصی برخوردار می باشند.

هدف: تعیین ترکیبات شیمیایی، خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس گیاه *Thymus Kotschyanus* یا کهلیک اوتی در محیط آزمایشگاهی و مدل غذایی

روش کار: در این مطالعه اسانس گیاه کهلیک اوتی تهیه و با GC-MS ترکیبات آن شناسایی و مقدار ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی اسانس با استفاده از روش استاندارد و خاصیت آنتی اکسیدانی آن با روش DPPH تعیین شد. خاصیت ضد میکروبی اسانس علیه باکتری *E.coli* O157:H7 در محیط کشت و مدل غذایی دوغ به همراه پارامترهای فیزیکی شیمیایی و حسی دوغ طی یک دوره ۱۴ روزه بررسی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج آنالیز اسانس نشان داد که تیمول با ۵۱/۱ درصد بیشترین مقدار را در بین اجزای سازنده اسانس دارد. مقدار ترکیبات فنولیک $82 \pm 6/43 \mu\text{g/mL}$ و میزان فلاونوئید آن $30/79 \pm 0/5 \mu\text{g/mL}$ اسانس بود. ارزیابی آزمون آنتی اکسیدانی نشان داد که میزان IC_{50} اسانس $32/35 \mu\text{g/mL}$ و MIC آن که با روش میکرو دایلوژن تعیین شد $470 \mu\text{g/mL}$ اسانس بود. اسانس دارای خاصیت ضد میکروبی قوی بوده و در غلظت های پایین اضافه شده به دوغ در همان روزهای اولیه باکتری *E.coli* O157:H7 مورد مطالعه را از بین برد. بر اساس نتایج بدست آمده اسانس تغییرات معنی داری در خواص فیزیکی شیمیایی دوغ ایجاد نمی کند به جز در مورد مواد جامد کل که دوغ فاقد اسانس با دوغ دارای ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm اسانس از نظر این خصوصیت اختلاف معنی داری دارد و دوغ دارای ۵۰ ppm اسانس بهترین طعم و مزه را ایجاد و قابلیت پذیرش بالاتری در بین داورها داشت.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده می توان از اسانس کهلیک اوتی در غلظت های پایین در تولید دوغ استفاده کرد و جهت استفاده در صنایع دیگر بایستی مطالعات بیشتری روی آن انجام گیرد و هم چنین اسانس از توان آنتی اکسیدانی مناسبی برخوردار بوده بنابراین می توان از آن در ترکیب با سایر نگه دارنده ها جهت محافظت مواد غذایی در مقابل انواع سیستم های اکسیداتیو استفاده کرد.

کلید واژه: اسانس، کهلیک اوتی، فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد میکروبی، دوغ

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
-------	------

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه	۲
۲-۱- بیان مسئله و ضرورت اجرای طرح	۴
۳-۱- اهداف اصلی طرح	۷
۴-۱- اهداف فرعی طرح	۷
۵-۱- اهداف کاربردی طرح	۷
۶-۱- فرضیات یا سوالات پژوهش	۸
۷-۱- مدل غذایی دوغ	۸

فصل دوم: مروری بر مطالعات پیشین

۱-۲- بیماری های ناشی از غذا	۱۰
۲-۲- عوامل بیماری زای مواد غذایی	۱۱
۳-۲- باکتری مورد مطالعه	۱۱
۱-۳-۲- باکتری اشیریشیا کلای	۱۱
۲-۳-۲- خصوصیات بیماری و مکانیسم بیماری زایی باکتری	۱۲
۳-۳-۲- گروه EPEC	۱۲
۴-۳-۲- گروه ETEC	۱۳
۵-۳-۲- گروه EIEC	۱۳
۶-۳-۲- گروه EHEC	۱۴
۷-۳-۲- ارتباط باکتری با مواد غذایی و کنترل آن	۱۴
۴-۲- آویشن	۱۶
۵-۲- اسانس ها چه هستند؟	۱۸
۱-۵-۲- نقش اسانس ها در داخل گیاهان	۱۹
۲-۵-۲- ترکیبات شیمیایی اسانس ها	۲۰

۲۰ هیدروکربن ۱-۲-۵-۲
۲۱ ترین ها ۲-۲-۵-۲
۲۱ مونو ترین ها ۱-۲-۲-۵-۲
۲۲ سزکوئی ترین ها ۲-۲-۲-۵-۲
۲۲ دی ترین ها ۳-۲-۲-۵-۲
۲۲ الکل ها ۳-۲-۵-۲
۲۳ آلدئیدها ۴-۲-۵-۲
۲۳ اسیدها ۵-۲-۵-۲
۲۳ استرها ۶-۲-۵-۲
۲۳ کتون ها ۷-۲-۵-۲
۲۴ لاکتون ها ۸-۲-۵-۲
۲۵ روش های استخراج اسانس ۶-۲-۵-۲
۲۵ فشار سرد ۱-۶-۲
۲۶ استخراج با حلال ۲-۶-۲
۲۶ اینفلوریج ۳-۶-۲
۲۶ تقطیر آبی ۴-۶-۲
۲۷ استخراج با CO ₂ و یا CO ₂ فوق بحرانی ۵-۶-۲
۲۷ تقطیر توربینی ۶-۶-۲
۲۸ تقطیر با بخار ۷-۶-۲
۳۰ تاریخچه استفاده از اسانس ۷-۲
۳۰ کاربرد های امروزی اسانس ها ۸-۲
۳۱ آزمایشات فعالیت ضد میکروبی در سیستم های غذایی ۹-۲
۳۳ گوشت و فرآورده های آن ۱-۹-۲
۳۴ ماهی ۲-۹-۲
۳۴ محصولات شیری ۳-۹-۲
۳۴ سبزیجات ۴-۹-۲
۳۵ برنج ۵-۹-۲

۳۵	۶-۹-۲- میوه ها
۳۵	۱۰-۲- طرز عمل فعالیت ضد باکتری
۳۷	۱۱-۲- حساسیت ارگانیزم های گرم مثبت و گرم منفی
۳۸	۱۲-۲- سینرژیزم و آنتاگونیسم بین ترکیبات اسانس
۳۹	۱۳-۲- سینرژیزم و آنتاگونیسم بین ترکیبات اسانس و نگه دارنده های مواد غذایی

فصل سوم: مواد و روش ها

۴۲	۱-۳- مقدمه
۴۲	۲-۳- نوع مطالعه
۴۲	۳-۳- جمع آوری و آماده سازی گیاه
۴۲	۴-۳- تهیه اسانس
۴۳	۵-۳- تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه کهلیک اوتی
۴۴	۶-۳- ارزیابی ترکیبات فنولیک
۴۵	۷-۳- میزان فلاونوئیدها
۴۵	۸-۳- بررسی خواص آنتی اکسیدانی اسانس با روش DPPH
۴۶	۹-۳- خصوصیات ضد میکروبی و بهداشتی اسانس علیه باکتری اشرشیا
۴۷	۱۰-۳- ارزیابی خصوصیات حسی
۴۸	۱۱-۳- آنالیز فیزیکوشیمیایی
۴۸	۱-۱۱-۳- Ph دوغ
۴۸	۲-۱۱-۳- اسیدپته قابل تیتراسیون
۴۹	۳-۱۱-۳- مواد جامد کل
۴۹	۴-۱۱-۳- چربی دوغ
۵۰	۱۲-۳- متغیرها

فصل چهارم: یافته ها

۵۴	۱-۴- نتایج آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده
۵۶	۲-۴- فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی اسانس
۵۸	۳-۴- ارزیابی خصوصیت ضد میکروبی اسانس
۵۸	۱-۳-۴- روش میکرودايلوشن

۵۸ اثر ضد باکتریایی اسانس در مدل غذایی
۵۹ ارزیابی حسی دوغ حاوی غلظت های مختلف اسانس
۶۰ بررسی خواص فیزیکی شیمیایی دوغ حاوی غلظت های مختلف اسانس

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۶۶ بحث
۷۴ نتیجه گیری کلی
۷۵ پیشنهادات
۷۶ منابع
۸۵ چکیده انگلیسی

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲ روغن‌های بدست آمده از بخش‌های مختلف گیاهان	۱۸
جدول ۱-۳ جدول متغیر ها	۵۳
جدول ۱-۴ آنالیز ترکیبات اسانس کهلپک اوتی	۵۴
جدول ۲-۴ IC50 اسانس و کنترل ها	۵۶
جدول ۳-۴ ترکیبات فنولیک	۵۷
جدول ۴-۴ ترکیبات فلاونویدی	۵۸
جدول ۵-۴ شمارش باکتری E.coli در نمونه های دوغ با غلظت های مختلف اسانس.....	۵۹
جدول ۶-۴ میانگین داده های نمره دهی داورها به قابلیت پذیرش دوغ	۶۰
جدول ۷-۴ میانگین داده های Ph در دوغ با غلظت های مختلف اسانس در طول دوره ۱۴روزه.....	۶۱
جدول ۸-۴ میانگین داده های چربی در دوغ با غلظت های مختلف اسانس در طول دوره ۱۴روزه.....	۶۲
جدول ۹-۴ میانگین داده های مواد جامد کل در دوغ با غلظت های مختلف اسانس در طول دوره ۱۴روزه.....	۶۳
جدول ۱۰-۴ میانگین داده های اسیدیته در دوغ با غلظت های مختلف اسانس در طول دوره ۱۴روزه.....	۶۴
نمودار ۱-۴ کروماتوگرام اسانس کهلپک اوتی	۵۵
نمودار ۲-۴ منحنی استاندارد اسید گالیک	۵۷
نمودار ۳-۴ تغییرات Ph دوغ	۶۱
نمودار ۴-۴ تغییرات مواد جامد کل دوغ	۶۲
نمودار ۵-۴ تغییرات چربی دوغ	۶۳
نمودار ۶-۴ تغییرات اسیدیته قابل تیتراسیون دوغ	۶۴

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۲ بوته گل دار کهلیک اوتی	۱۶
شکل ۲-۲ گیاه بدون گل کهلیک اوتی	۱۷
شکل ۳-۲ بوته گیاه کهلیک اوتی	۱۷
شکل ۴-۲ فرمول ساختاری ایزوپرن	۲۱
شکل ۵-۲ فرمول ساختاری بعضی از اجزای منتخب اسانس‌های روغنی	۲۴
شکل ۶-۲ دیاگرام مربوط به تقطیر با بخار	۲۸
شکل ۷-۲ دیاگرام مربوط به تقطیر با بخار	۲۹
شکل ۸-۲ محل و مکانیسم فعالیت اسانس‌ها در سلول باکتری	۳۶
شکل ۱-۳ دستگاه GC-MS	۴۷
شکل ۲-۳ دستگاه اسپکتروفتومتر	۴۸

فهرست روابط ریاضی

فهرست	صفحه
رابطه ۱-۳ درصد بازداري رادیکالی	۴۹
رابطه ۲-۳ اسیدینه قابل تیتراسیون	۵۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

یکی از مشکلات موجود در مبحث مواد غذایی اکسیداسیون روغن ها است. اکسیداسیون یکی از مهم ترین و شناخته شده ترین دلایل فساد لیپیدها طی دوره ی نگه داری یا فرآوری آن ها محسوب می شود. روغن های خوراکی گیاهی حاوی مقادیر زیاد اسیدهای چرب غیر اشباع بسیار مستعد به اکسیداسیون می باشند. این فرآیند نه تنها با گسترش طعم تند، عطر ناخوشایند و رنگ پریدگی همراه است، بلکه ارزش تغذیه ای روغن ها و چربی ها را نیز کاهش می دهد و با تولید برخی از ترکیبات سمی و خطرناک، اثرات نامطلوبی را بر سلامتی انسان اعمال می نماید و اما برای جلوگیری از اکسیداسیون روغن های موجود در صنعت غذا از آنتی اکسیدان های سنتتیک که خود دارای اثرات مضری بر بدن انسان هستند استفاده می شود (Zhang et al, 2010). هم چنین حضور میکروارگانیسم ها و بخصوص باکتری ها در مواد غذایی اهمیت فراوانی از نظر بهداشت و سلامت عمومی و هم چنین از نظر کنترل کیفیت مواد غذایی برخوردار می باشد (Demirci et al, 2008).

میکروارگانیسم های بیماری زای موجود در مواد غذایی هر ساله خسارات جانی و مالی فراوانی در جهان به وجود می آورند. علاوه بر این فساد مواد غذایی در اثر رشد میکروارگانیسم ها همچنان به عنوان یک معضل در صنعت غذایی به شمار می رود. یکی از راه های جلوگیری از رشد و کنترل باکتری ها در مواد غذایی استفاده از نگه دارنده ها و ترکیبات ضد میکروبی است. به منظور جلوگیری از رشد یا کشتن برخی میکروارگانیسم های مضر تا مدت ها از نگه دارنده های شیمیایی استفاده می شد. اما امروزه با توجه به افزایش سطح آگاهی و نگرانی های عمومی در خصوص عوارض نگه دارنده های شیمیایی، تمایل به مصرف محصولات فاقد نگه دارنده یا با نگه دارنده طبیعی روبه افزایش است. بنابراین در سال های اخیر مطالعات زیادی پیرامون نگه دارنده های طبیعی مانند اسانس ها و عصاره های طبیعی صورت گرفته است. عصاره ها و اسانس های گیاهان دارویی و اجزای تشکیل دهنده آن ها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی می باشند (Burt, 2004). کاربردهای زیاد آن ها به منظور کنترل رشد باکتری های بیماری زای غذایی یا عامل فساد موجب به کارگیری آن ها به عنوان نگه دارنده های غذایی شده است. چون اسانس ها و عصاره های گیاهی و بسیاری از مواد غذایی جهت ایجاد طعم مطبوع بکار می روند، وجود هم زمان

خواص ضد میکروبی آن ها می تواند استفاده از آن ها را بدین منظور ترغیب نماید. اداره غذا و داروی آمریکا^۱ FDI نیز استفاده از اسانس های روغنی را به عنوان افزودنی های غذایی که عموماً بی خطر هستند^۲ GRAS به رسمیت شناخته است (Oussalah et al, 2007). امروزه ایمنی غذا یک مبحث مهم سلامت عمومی جامعه است و تخمین زده می شود که ۳۰ درصد مردم در کشورهای صنعتی از بیماری های ناشی از غذا رنج می برند. بنابراین هنوز به روش های جدید جهت کاهش یا حذف پاتوژن های غذایی در حد امکان با ترکیب یا روش های موجود نیاز است. یکی از روش های تولید غذای سالم استفاده از مواد با ساختار طبیعی است. استفاده از اسانس ها و عصاره های گیاهی به عنوان افزودنی های ضد باکتری و ضد قارچی یکی از این روش ها است (Bhurinder et al, 2001 and Reiter et al, 2009).

عبارت Essentail oil برگرفته از اسم گذاشته شده توسط جنبش پزشکی سوئیس در قرن ۱۶ میلادی است که این نام بخاطر ترکیبات موثر یک دارو به نام Quinta essential انتخاب شده است. اسانس ها یا روغن های اسانسی (روغن های فرار یا اتری) مایع های روغنی آروماتیکی هستند که از قسمت های مختلف یک گیاه تهیه می شوند (گل ها، شکوفه ها، دانه ها، برگ ها، شاخه ها، پوست، بوته ها، چوب، میوه ها و ریشه ها). اسانس ها می توانند به وسیله فشار، تخمیر، درگیری یا استخراج به دست آیند اما روش تقطیر بخار عموماً برای تولید اسانس ها به کار برده می شود. با یک تخمین در حدود ۳۰۰۰ نوع اسانس شناخته شده است که در حدود ۳۰۰ نوع آن ها از نظر تجاری، مخصوصاً به هدف تجارت عطر و چاشنی مهم اند و تعدادی نیز خواص ضد میکروبی دارند. در کنار خواص ضد میکروبی اسانس ها یا ترکیباتشان اثرات ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد مسمومیتی، ضد انگلی و ضد حشره آن ها نیز مشخص شده است (Bhurinder et al, 2001).

بیماری های حاصل از مصرف غذاهای آلوده به باکتری های پاتوژن از اهمیت فراوانی در بهداشت عمومی برخوردار بوده و سالانه خسارات جانی و مالی فراوانی را به جوامع تحمیل می نماید. به عنوان مثال در کشور کانادا هزینه درمان بیماری های ناشی از مصرف گوشت آلوده به پاتوژن های غذایی بالغ بر ۵۰۰ میلیون دلار در سال است. در سال ۱۹۹۹ مرکز کنترل و پیش گیری بیماری ها اعلام کرد که سالانه ۷۶ میلیون نفر در ایالات متحده بر اثر پاتوژن های غذایی بیمار می شوند. چنین بیماری هایی سالانه منجر به ۲۲۵۰۰۰ مورد بستری در بیمارستان و ۵۰۰۰

^۱American Food and Drug Administration

^۲Generally recognized and safe

مورد مرگ می‌گردد. مطابق ارزیابی دپارتمان کشاورزی ایالات متحده آمریکا (USDA) هزینه‌های پزشکی و زیان‌های اقتصادی ناشی از دور ریزی مواد غذایی که ایجادکننده بیماری‌های غذایی هستند در محدوده ۶/۵ تا ۳۴/۹ میلیارد دلار در هر سال است (رجحان، ۱۳۷۸).

کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی هم از نظر صنایع غذایی و کنترل کیفیت و هم از نظر بهداشت و سلامت عمومی حائز اهمیت فراوان است. یکی از راه‌های کنترل رشد باکتری‌های پاتوژن در مواد غذایی استفاده از نگه‌دارنده‌ها و ترکیبات ضد میکروبی می‌باشد. افزودن مواد شیمیایی به منظور نگه‌داری مواد غذایی معمولاً بر مبنای جلوگیری از رشد میکروبی یا کشتن و از بین بردن گروه‌هایی از میکروارگانیسم‌های مضر می‌باشد (Bhurinder et al, 2001).

۱-۲- بیان مسئله و ضرورت اجرای طرح

بیماری‌های حاصل از مصرف غذاهای آلوده به باکتری‌های پاتوژن و غذاهای فاسد از اهمیت فراوانی در بهداشت عمومی برخوردار بوده و سالانه خسارت‌های مالی و جانی فراوانی را به جوامع تحمیل می‌نماید. به عنوان مثال در کشور آمریکا در سال ۲۰۰۷ گزارش شده که هزینه درمان بیماری‌های ناشی از مصرف غذای آلوده به پاتوژن‌های غذایی بالغ بر ۳۰۰ میلیارد دلار می‌باشد (Oussalah et al, 2007). در طول دهه گذشته وقوع بیماری‌های میکروبی ناشی از مواد غذایی نه تنها در کشورهای در حال توسعه یا فقر بهداشتی بلکه در کشورهای توسعه یافته با استاندارد بالای بهداشتی نیز رو به افزایش بوده و این در حالی است که وقوع عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی اغلب گزارش نشده باقی مانده و آمار دقیق از میزان ابتلا خصوصاً در کشورهای در حال توسعه امکان پذیر نمی‌باشد (Sing, 2007). بیماری‌های غذایی از نظر تقسیم بندی جزء بیماری‌های روده ای تقسیم بندی می‌شوند و از نظر اهمیت در آمریکا بعد از بیماری‌های ریوی در مقام دوم قرار دارند. باکتری‌ها مهم‌ترین عامل میکروبی بیماری‌های ناشی از مواد غذایی می‌باشند. دو تیپ باکتری مولد بیماری در مواد غذایی وجود دارند، تیپ اول تحت عنوان باکتری‌های عامل مسمومیت غذایی است که از طریق مصرف مواد غذایی حاوی سم باکتری منتج از رشد باکتری در غذا حاصل می‌شود که نمونه‌های مهم آن کلستریدیوم بوتولینوم و استافیلوکوکوس ارئوس می‌باشد.

تیپ دوم باکتری تحت عنوان باکتری های عامل عفونت غذایی است که از طریق مصرف غذای حاوی باکتری های زنده باعث بیماری می گردد و باکتری با تکثیر خود یا تولید متابولیت های خاص عوارضی در بدن میزبان ایجاد می کند مثل اکثر باکتری های عامل عفونت غذایی (Bhurinder et al, 2001). یکی از راه های کنترل رشد باکتری های پاتوژن در محصولات غذایی استفاده از نگه دارنده ها و ترکیبات ضد میکروبی می باشد (Kamkar et al, 2010).

اکسیداسیون یکی از مهم ترین و شناخته شده ترین دلایل فساد لیپیدها طی دوره ی نگه داری یا فرآوری آن ها محسوب می شود. این فرآیند نه تنها با گسترش طعم تند، عطر ناخوشایند و رنگ پریدگی همراه است، بلکه ارزش تغذیه ای روغن ها و چربیها را نیز کاهش می دهد و با تولید برخی از ترکیبات سمی و خطرناک، اثرات نامطلوبی را بر سلامتی انسان اعمال می نماید (Zhang et al, 2010).

برای جلوگیری از این اثرات نامطلوب در صنعت غذا از آنتی اکسیدان های سنتتیک استفاده می شد ولی امروزه با مطالعات انجام شده در مورد این آنتی اکسیدان ها ثابت شده که خود این مواد شیمیایی برای سلامتی مضر هستند (Zhang et al, 2011 and wojcik et al, 2010).

از طرفی امروزه نگرانی عمومی در مورد عوارض نگه دارنده های شیمیایی موجب تمایل مصرف کنندگان به استفاده از محصولات طبیعی شده که فاقد نگه دارنده بوده و یا در آن ها از نگه دارنده های طبیعی استفاده شده باشد. به همین علت در سال های اخیر مطالعات بسیاری پیرامون نگه دارنده های طبیعی صورت گرفته است. از جمله این نگه دارنده ها می توان به اسانس ها و عصاره های گیاهی اشاره نمود. اسانس ها و عصاره های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آن ها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی می باشند. کاربردهای زیاد آن ها به منظور کنترل رشد باکتری های بیماری زای غذایی و یا عامل فساد و آنتی اکسیدان های طبیعی موجب به کارگیری آن ها به عنوان نگه دارنده های غذایی شده است. استقبال از این موضوع از یک طرف به علت رویکرد جدید عموم مردم و از طرف دیگر سازمان های بین المللی و ملی مسئول در زمینه بهداشت مواد غذایی و نیز صنایع غذایی در استفاده از نگه دارنده های طبیعی مختلف به جای شیمیایی (که در حال حاضر مورد استفاده قرار می گیرد) می باشد (Maleki et al, 2009).

از جمله گیاهان دارویی می توان به Thymus از تیره نعناع (Labiatae) و شامل ۱۴ گونه در ایران، که بصورت محلی آویشن گفته می شوند و یکی از گونه های آن Thymus kotschyanus (کهلپیک اوتی) است (مظفریان، ۱۳۷۵). بررسی فیتوشیمیایی گونه های مختلف آویشن بیانگر وجود ترکیبات فنولی مانند تیمول، کارواکرول، اسید کافئیک، ایگنول، ترپنوئیدها، ساپونین، فلاونوئیدها و غیره در آن ها است که از آن ها بطور گسترده در صنعت غذا و مواد آرایشی و بهداشتی استفاده می شود و دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد درد، آنتی اکسیدانی و حشره کشی می باشند (Puertas et al, 2002 and Ultee et al, 2001 and Aydin et al, 1996). علاوه بر این در بخش های مختلف ایران از گل های انواع گونه های آویشن نوشیدنی های ضد نفخ، ضد اسپاسم، ضد سرفه، ضد خلط و هضم کننده غذا در دستگاه گوارش تهیه و استفاده می شود (زرگری، ۱۳۷۷). نتایج اثربخشی Thymus kotschyanus بر بیماران مبتلا به سندروم روده تحریک پذیر طی دو مطالعه کارآزمایی بالینی بیانگر این بوده که علائم شایعی نظیر شدت درد شکمی، نفخ، اسهال و یبوست در گروه دریافت کننده دارو به میزان معنی داری کاهش یافته است (صابرنوایی، ۱۳۸۹).

با توجه به نقش گیاهان دارویی در سلامتی و درمان بیماری ها از دیدگاه طب سنتی، گستردگی منابع طبیعی در کشور، سهل الوصول و مقرون به صرفه بودن آن ها برای مصرف، رواج مصرف در عامه مردم و هم چنین مضرات ترکیبات و نگرانی های شیمیایی مصرفی در صنایع غذایی در این تحقیق بر آن شدیم که اجزای تشکیل دهنده و خواص کاربردی اسانس کهلپیک اوتی را مورد بررسی قرار دهیم تا بدین طریق ضمن استفاده بهینه از این منابع گسترده امکان استفاده از یک منبع گیاهی به جایگزینی منابع شیمیایی را فراهم آورده و در نهایت گامی جهت پیشرفت بهداشت و ایمنی مواد غذایی جامعه برداشته شود.

۱-۳- هدف اصلی:

تعیین ترکیبات شیمیایی، خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس گیاه کهلپیک اوتی (Thymus kotschyanus) در محیط آزمایشگاهی و مدل غذایی دوج

۴-۱- اهداف فرعی:

- تعیین ترکیبات موجود در اسانس گیاه مورد نظر
- تعیین خاصیت ضد باکتریایی اسانس گیاهی در محیط کشت
- تعیین خاصیت ضد باکتریایی اسانس گیاهی مدل غذایی
- تعیین خاصیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی موجود در اسانس گیاهی
- تعیین تأثیر اسانس بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی دوغ
- تعیین تأثیر اسانس بر خصوصیات ارگانولپتیکی دوغ

۵-۱- اهداف کاربردی

با توجه به نگرانی‌های عمومی در خصوص عوارض نگه دارنده های شیمیایی تمایل به مصرف محصولاتی است که فاقد نگه دارنده بوده و یا در آن ها از نگه دارنده های طبیعی استفاده شده است. به همین دلیل در سال‌های اخیر مطالعات زیادی پیرامون نگه دارنده های طبیعی صورت گرفته است. بنابراین نیاز به شناسایی ترکیبات طبیعی جدید با خواص نگه دارندگی در محصولات غذایی روز به روز بیشتر می شود تا علاوه بر افزایش ماندگاری غذا، مصرف کننده را از اثرات مضر نگه دارنده های شیمیایی و سنتتیک مصون نگه دارد. حال با توجه به اینکه کشور ما از نظر گیاهان دارویی غنی و این منابع بصورت گسترده در بیشتر مناطق جغرافیایی کشور در دسترس می باشند لذا با انجام تحقیق و پژوهش در این زمینه می توان انواع گونه های گیاهی جدید و اسانس های حاصل از آن ها را با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی و نگه دارندگی بهتر به صنعت مواد غذایی کشور معرفی کرد تا با استفاده از این مواد، مصرف کننده مواد غذایی را از اثرات مضر ترکیبات نگه دارنده سنتتیک و شیمیایی مصون نگه داشت و علاوه بر افزایش ماندگاری غذا، خصوصیات

ارگانولپتیکی آن را ارتقا بخشید و متولیان صنعت غذا را از هزینه های بالای واردات ترکیبات نگه دارنده شیمیایی خلاص کرده و صرف جویی اقتصادی بیشتر در این صنعت انجام گیرد.

۱-۶- فرضیات یا سوالات پژوهش

- ۱) چه ترکیباتی در اسانس گیاهی کهلیک اوتی وجود دارد؟
- ۲) آیا تاثیر اسانس کهلیک اوتی بکار رفته بر خصوصیات فیزیکی شیمیایی دوغ در مقایسه با گروه کنترل مطلوب است؟
- ۳) آیا تاثیر اسانس گیاهی بکار رفته در این تحقیق بر خصوصیات ارگانولپتیکی دوغ مطلوب بوده یا ایجاد طعم و مزه نامناسب می نماید؟
- ۴) آیا اسانس بکار رفته در این مطالعه، در دوغ از خصوصیات ضد میکروبی مناسبی علیه باکتری پاتوژن اشرشیا کلای برخوردار می باشد؟
- ۵) آیا اسانس گیاهی بکار رفته از خاصیت آنتی اکسیدانی مناسبی برخوردار می باشد؟

۱-۷- مدل غذایی دوغ:

کلمه دوغ از واژه فارسی دوشیدن اقتباس است و در لغت به معنای ماده حاصل از دوشیدن است. دوغ یکی از نوشیدنی های سنتی ایران است که با محصولات مشابه در کشورهای دیگر مثل آیرن نوشیدنی ویژه ترکیه نسبتاً مشابه است. در گذشته، دوغ به فرآورده ای گفته می شد که پس از رقیق سازی ماست پر چرب با آب و جداسازی چربی آن با استفاده از مشک بر جای می ماند. امروزه دوغ روش تولید و ویژگی های فیزیکی، شیمیایی، میکروبی و حسی استاندارد دارد که در قسمت مواد و روش کار به بعضی از آن ها اشاره شده است.

فصل دوم

مروری بر مطالعات پیشین

۲-۱- بیماری های ناشی از مواد غذایی و اهمیت آن ها

شیوع بیماری های ناشی از مصرف مواد غذایی همواره یکی از مشکلات موجود در سراسر جهان بوده است. این بیماری ها همواره از مصرف یک ماده غذایی بوجود آمده و هزینه هایی که صرف بهبود این بیماری ها در خانواده- های مختلف می گردد گاهی بسیار بالا بوده بطوری که از توان خانواده خارج می باشد. بیست و پنج سال پیش پزشکان کشورهای صنعتی اعتقاد داشتند که بیماری های عفونی، بلایی متعلق به گذشته است. همراه با صنعتی شدن، بهداشت، مسکن و تغذیه بهبود یافته و جمعیت ساکن در این کشورها نه فقط از کاهش بی سابقه تعداد بیماران و میزان مرگ و میر آنان بهره مند شدند بلکه امید به زندگی در آنان نیز افزایش یافت. در جهان در حال توسعه جایی که فقر و آشوب های اجتماعی، هدف های پیش پا افتاده بهداشتی را نیز خارج از دسترس قرار داده است، مردم در عین حال چشم انتظار روزگاری هستند که ارتقای کیفیت زندگی، آینده ای خالی از بیماری را برای شان به ارمغان آورد (Daniels et al, 2002).

بیماری های عفونی هنوز عامل ۴۵ درصد از مرگ و میر در کشورهای فقیر و عامل نیمی از مرگ های زود هنگام در سراسر دنیا می باشد. سایر علائم بخصوص اسهال، دهیدراته شدن و بهم خوردن تعادل بازی و اسیدی عواملی است که می تواند منجر به مرگ در این بیماری ها گردد. سالانه صدها میلیون نفر از مردم سراسر دنیا دچار مسمومیت غذایی ناشی از فرآورده های شیری، فرآورده های قنادی و فرآورده های مرغ و گوشتی می شوند. باید توجه داشت که این بیماری ها در برخی موارد می تواند منجر به بروز اثرات بهداشتی مزمن مانند بیماری های فصلی اختلالات دستگاه ایمنی و یا نارسایی های کلیوی گردند (Loir et al, 2003).

شیوع سالانه اسهال (که بیش از ۷۰ درصد آن به دلیل مصرف آب و غذای آلوده است) در کودکان زیر ۵ سال ۱/۵ میلیون نفر در سال است که باعث مرگ و میر بیش از سه هزار کودک می شود. در کشورهای صنعتی علی رغم پیشرفت تکنولوژی و کاربرد روش های جدید تولید و نگهداری مواد غذایی، هنوز سالانه ۵-۱۰ درصد جمعیت آن ها به این بیماری ها مبتلا می شوند (Hetzal et al, 2004). پدیده جهانی شدن و افزایش مسافرت ها و توسعه گردشگری و همچنین افزایش مصرف غذا در خارج از منزل در جوامع مختلف بیماریهای منتقله از غذا را به عنوان یک مشکل بهداشتی جهانی مطرح کرده است. به عنوان مثال در آمریکا سالانه ۷۶ میلیون مورد بیماری منتقله از

غذا با ۳۲۵۰۰۰ نفر بستری و ۵۲۰۰۰ مورد مرگ گزارش می شود که هزینه صرف شده برای کنترل آن بیش از ۱۷ میلیارد دلار تخمین زده می شود (Mead, 1999).

۲-۲ - عوامل بیماری زای مواد غذایی

باکتری ها مهم ترین عامل بیماریزای میکروبی ناشی از مواد غذایی می باشند. دو تیپ باکتری مولد بیماری در مواد غذایی وجود دارد. تیپ اول تحت عنوان باکتری های عامل مسمومیت غذایی^۱ حاوی سم باکتری منتج از رشد باکتری در غذا حاصل می شود که نمونه های آن مسمومیت غذایی حاصل از کلستریدیوم بوتولینوم و استافیلوکوکوس ارئوس می باشد. تیپ دوم باکتری تحت عنوان باکتری های عامل عفونت مواد غذایی است که از طریق مصرف غذای حاوی باکتری زنده باعث بیماری می شوند و باکتری با تکثیر خود یا متابولیت های خاص، عوارضی را در بدن ایجاد می کنند (Bhurinder et al, 2001).

۳-۲ - باکتری مورد مطالعه

۳-۲-۱ - اشرشیا کلای E.coli

اشرشیا کلای جنس شاخص خانواده انتروباکتریاسه و اشرشیا کلای گونه بارز در این جنس است. این ارگانیسم کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، میله ای کوتاه، گرم منفی و غیر اسپورزاست. عموماً به عنوان بخشی از فلور میکروبی طبیعی روده انسان و بسیاری از حیوانات محسوب می شود. باکتری عضو خانواده انتروباکتریاسه دارای خصوصیات عمومی این خانواده می باشد. این باکتری یک میکروب هوازی بی هوازی اختیاری شایع در روده حیوان و انسان است (مرتضوی و صادقی ماهونک، ۱۳۸۱).

¹orne Bacterial Intoxication Food B

۲-۳-۲- خصوصیات بیماری و مکانیسم بیماری زایی باکتری

اشرشیاکلاهی بیماری زای روده ای عامل مهم اسهال در کشورهای در حال توسعه و مکان های با فقر بهداشتی می باشد. یکی از بیماری های حاصل از مواد غذایی توسط این باکتری در سال های اخیر وقوع شدید کولیت خونریزی دهنده می باشد که توسط سویه $O_{157} : H_7$ ایجاد می شود. چهار تحت گروه اشرشیا کلاهی عامل اسهال در انسان وجود دارد که در زیر به آن ها اشاره می شود :

(۱) تحت گروه اشرشیاکلاهی بیماری زای روده ای یا $EPEC^1$

(۲) تحت گروه اشرشیاکلاهی توکسین زای روده ای یا $ETEC^2$

(۳) تحت گروه اشرشیاکلاهی مهاجم روده ای یا $EIEC^3$

(۴) تحت گروه اشرشیا کلاهی توده ای روده ای یا $EHEC^4$

با توجه به بیماری های خاص ایجاد شده توسط انواع بیماری زای اشرشیا کلاهی در انسان روز به روز به اهمیت آن افزوده می شود (رضویلر، ۱۳۸۷).

۲-۳-۳- گروه $EPEC$

این گروه مسئول بسیاری از بیماری های اسهالی کودکان است. دوره کمون ۱۲ تا ۳۶ ساعت می باشد و به دنبال آن اسهال آبکی معمولاً تب دار که گاهی حاوی موکوس و به ندرت حاوی خون است ظاهر می گردد. استفراغ معمولاً همراه اسهال دیده می شود (رضویلر، ۱۳۸۷).

^۱ Entropathogenic E. coli

^۲ Entrotoxigenic E. coli

^۳ Enteroinvasive E. coli

^۴ Entrohaemorrhagic E. coli

۲-۳-۴- گروه ETEC

علائم این بیماری بیانگر تولید توکسین‌هایی توسط باکتری می‌باشد. سویه‌های مولد توکسین حساس به حرارت (LT^1) که مشابه کلرا توکسین^۲ یا سم وبا می‌باشد علائمی ایجاد می‌کند که در نهایت شدت و نوع آن مشابه علائم وبای کلاسیک است. اسهال حاوی مدفوع آبکی و تقریباً همیشه بدون موکوس و بدون خون و اغلب همراه با دل درد و استفراغ می‌باشد. تب اغلب موجود نیست و حتی حرارت بدن ممکن است از حد طبیعی کمتر باشد. از دست رفتن آب بدن شایع و ممکن است به مرگ منتج گردد. گاهی توکسین مقاوم به حرارت (ST^3) عامل بیماری بوده و دوره کمون ۴ ساعت و گاهی کمتر است (رضوی‌لر، ۱۳۸۷).

۲-۳-۵- گروه EIEC

علائم شبیه شیگلوزیس می‌باشد. اسهال خونی، مدفوع موکوسی همراه با احساس فشار و درد در موقع دفع مدفوع، تب و کولیت از علائم شایع بیماری است. شدت بیماری ممکن است از نوع ملایم تا بی نهایت شدید تغییر کند (رضوی‌لر، ۱۳۸۷).

۲-۳-۶- گروه EHEC

این گروه دو نوع بیماری ایجاد می‌کند که عبارتند از: کولیت خونریزی دهنده و دیگری سندرم HUS^4 . بیماری کولیت خونریزی دهنده به علت ایجاد ادم در لایه موکوس کولون و تولید زخم در آن سبب خونریزی از روده می‌شود. دوره کمون از یک تا ۱۴ روز میانگین ۸ روز تغییر می‌کند. علائم بیماری با درد شدید همراه با اسهال

^۱ Labile toxin^۲ Cholera toxi^۳ Stable toxi^۴Haemolytic Uraemic Syndrom

آبکی شروع و تهوع و استفراغ نیز در مرحله اول بیماری ظاهر می شود. نفخ یکی دیگر از علائم بیماری است و شدت درد شدیدتر از آپاندیست گزارش شده و در مورد زنان درد آن مشابه به درد زایمان می باشد و اسهال خونی یک تا ۲ روز بعد از بیماری ظاهر می شود. تب معمولاً وجود ندارد ولی در افراد مسن ممکن است مشاهده شود. بهبود معمولاً وضع مشخصی ندارد میزان مرگ و میر در بعضی موارد بیش از ۳۶٪ می باشد. اگر چه اسهال خونی یکی از خصوصیت‌های شایع عفونت های EHEC می باشد. ولی این علامت معمولاً همراه با سرو تیپ E.coli O157:H7 بوده و در بیماری تولید شده با غیر این سروتیپ مدفوع ممکن است آبکی بماند. سندرم HUS با اسهال، کم خونی، ترومبوسیتوپنی و تخریب حاد کلیه همراه است. صدمات کلیوی و مرگ ممکن است چندین سال پس از وقوع علائم حاد بیماری حاصل شود. سروتیپ O157:H7 به عنوان شایع‌ترین عامل سندرم HUS شناخته شده است (رضوی‌لر، ۱۳۸۷).

۲-۳-۷- ارتباط باکتری با مواد غذایی و کنترل آن

منبع اصلی E.coli در محیط احتمالاً مدفوع انسان های آلوده به عفونت می‌باشد ولی ممکن است حیوانات نیز به عنوان مخزن عمل نمایند. مدفوع و آب‌های غیر تصفیه شده بیشترین منابع آلودگی مواد غذایی به این میکروب هستند. وقتی که ای کلای از غذا جدا گردید سروتیپ‌های بیماری‌زا معمولاً موجود نیستند و یا درصد خیلی کمی از کل اشرشیا کلای جدا شده بیماری‌زا می‌باشند (رضوی‌لر، ۱۳۸۷). به طور کلی میزان انتشار سویه های EHEC در گوشت، شیر، طیور و فرآورده های دریایی تا حد زیادی متغیر است. انسان ها به عنوان مخزن عمده برای سویه های E.coli آنتروتوکسین زا و E.coli مهاجم روده ای شناخته شده‌اند. بر عکس در مورد سویه های خونریزی دهنده O157:H7 حیوانات مخزن میکروب می باشند. لذا مواد غذایی با منشأ دامی ممکن است از طریق کشتار آلوده و یا بعد از عمل آوری مجدداً آلوده شوند. با توجه به این موارد شیوع بیماری‌های ناشی از EHEC که در نتیجه مصرف گوشت گاو حاصل شده اند بیشتر از مواردی است که از سایر منابع غذایی به وجود آمده اند. اعتقاد بر این است که گاوهای شیری عامل اصلی این باکتری می‌باشند. کنترل اشرشیا کلای در مواد غذایی می‌تواند از

طریق کنترل کلی فرم ها عملی شود. این کنترل خصوصاً معطوف کلی فرم در پنیر می باشد زیرا وضعیت رسانیدن و تهیه پنیر می تواند پنیر را به منبع آلودگی کلی فرم ها تبدیل نماید. کنترل اشرفیا کلای در گوشت را می توان با پخت کامل و اجتناب از آلودگی مجدد با وسایل و آب عملی نمود. مشخص نمودن نقاط بحرانی کنترل در آلودگی به کلی فرم می تواند مفید باشد. حساسیت حرارتی باکتری به گونه ای است که اگر مواد غذایی به طرز صحیح پخته شود از بروز بیماری جلوگیری به عمل می آید. در اماکن تهیه و سرویس مواد غذایی مسئله پخت و مدت نگه داری، وضعیت حرارت و نیز بهداشت شخصی کارگران مواد غذایی بایستی مورد توجه قرار گیرد (رضوی، ۱۳۸۷).

۲-۴- آویشن

آویشن که در منابع طب سنتی به نام های صعتر، کهلیک اوتی، آبشن و آوشن نامبرده شده است. آویشن ها گیاهانی چند ساله هستند که به اشکال بوته ای، بالشتکی یا کپه ای با فرم افراشته و ارتفاع کمتر از ۵۰ سانتی متر دیده می شوند. ساقه آن ها چهار گوش یا کم و بیش چهار گوش و یا با مقطع گرد و معمولاً پوشیده از کرک است. برگ آن ها متقابل و به شکل های خطی تا دایره ای بوده و دارای دم برگ کوتاه یا فاقد آن و رگ برگ ها برجسته و مشخص، خصوصاً در سطح زیرین برگ ها است. برگ ها معمولاً پوشیده از کرک های ساده تا چند سلولی هستند. گل آن ها به رنگ های صورتی، سفید، قرمز، ارغوانی و یا بنفش بوده و به صورت گل آذین کروی یا بیضی و در انتهای شاخه ها دیده می شوند. در طب سنتی ایران برای این گیاه خواص متعددی از جمله: بازکننده سده ها، مقطع، مجفف، مبهی، اشتها آور و پاک کننده ریه، معده، جگر و امعا از رطوبات و بلاغم قائل هستند. بررسی ها نشان می دهد که می توانیم آویشن را معادل نام علمی جنس *Thymus*، از خانواده نعنا (*Labiatae*) قرار دهیم که دارای ۱۴ گونه در ایران است و گونه های زیر دارای استفاده عمومی می باشند.

(۱) آزرابه *T. kotschyanus* Boiss. & Hohe

(۲) آویشن ایرانی *T. persicus* (Ronniger ex Rech.f.Jalas)

(۳) آویشن دنایی *T. daenensis* Celak

۴) آویشن کرکدار L. T. pubescens serpyllum. T. Boiss. et Kotschy ex Celak. Syn

و همچنین گونه دیگری تحت عنوان آویشن باغی T. vulgaris L که بومی اروپا است و در ایران به صورت کاشته شده موجود است. یک گونه معروف به آویشن شیرازی در ایران وجود دارد که از جنس زاتاریا و گونه مول تی فلورا (Zataria multiflora Boiss) بوده و از همان خانواده نعنا است (جم زاد، ۱۳۸۸).



شکل ۱-۲ بوته گل دار گیاه کهلیک اوتی



شکل ۲-۲ گیاه کهلیک اوتی بدون گل



شکل ۳-۲ بوته گیاه کهلیک اوتی

۵-۲ - اسانس‌ها چه هستند؟

اسانس‌ها ترکیبات معطر و فراری هستند که توسط گیاهان تولید می‌شوند. هر کدام از این مایعات پیچیده و با ارزش و از گونه‌های خاصی از گیاهان استخراج می‌شوند. هر گونه گیاهی از مناطق خاصی از جهان منشأ می‌گیرد که با شرایط خاص منطقه، محیط زیست، گیاهان و جانوران آن منطقه سازگار شده‌اند. اسانس‌ها غالباً به عنوان نیروی زندگی گیاهان نامیده می‌شوند. برخلاف روغن‌های چرب این روغن‌ها فرار، تغلیظ شده و مواد استخراج شده از گل‌ها، برگ، دانه، پوست، رزین و یا پوست میوه هستند. مقدار اسانس موجود در گیاهان می‌تواند از ۰/۰۱ تا ۱۰ درصد کل گیاه متغیر باشد. برای دستیابی به چند پوند اسانس نیاز به داشتن چندین تن مواد گیاهی است. این روغن‌ها دارای خاصیت ضد میکروبی هستند و طیف وسیعی از آن‌ها نیز دارای خاصیت درمانی هستند. این روغن‌ها اغلب برای طعم دهی، درمانی یا بوی تند و زننده در طیف وسیعی از محصولات از جمله مواد غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی بکار می‌رود. اسانس‌ها نمی‌توانند وسیله روغن‌های سنتزی جایگزین شوند زیرا شامل طیف وسیع و کاملی از ترکیبات هستند که تقلید و تقلب در آن‌ها به آسانی نمی‌تواند صورت بگیرد (زرگری، ۱۳۷۷).

جدول ۱-۲ روغن‌های بدست آمده از بخش‌های مختلف گیاهان

چوب	توت‌ها	دانه‌ها	پوست میوه	پوست درخت	گل‌ها	برگ‌ها
کافور	لفل شیرین	بادام	ترنج	سنا	بابونه	ریحان
سدر	سرو کوهی	رازیانه	میوه انگور	دارچین	کلاری سیج	دارچین
چوب رز		کرفس	لیمو		میخک	اوکالیپتوس
چوب صندل		ریزه سبز	پرتقال		شمعدانی	پونه کوهی
-		جوز	نارنگی		زوفا	نعناع هندی
-		-	لیمو ترش		یاسمین	کاج
-		-	-		اسطوخودوس	رز ماری
-		-	-		مرز نجوش	نعناع
-		-	-		نارنجی	درخت چای
-		-	-		گل سرخ	آویشن

۲-۵-۱- نقش اسانس‌ها در داخل گیاهان

اسانس‌ها از واکوئل‌های روغنی در گل، برگ، ساقه، ریشه، دانه، چوب و پوست استخراج می‌شوند. اسانس‌ها از سایر روغن‌های گیاهی از قبیل روغن نباتی، روغن مغز و دانه‌ها متفاوت بوده و از اسیدهای چرب مختلفی ساخته شده و بطور کلی با آن‌ها متفاوتند. اسانس‌ها توسط گیاهان به همان شیوه که انسان از آن‌ها برای مبارزه با عفونت، ترکیبات شبه هورمونی، عوامل بازسازی سلولی و به عنوان دفاع در مقابل دشمنان قارچی، ویروسی و

حیوانات استفاده می کند توسط گیاهان نیز مورد استفاده قرار می گیرد (Essential Oils Introduction: from the webpage).

۲-۵-۲- ترکیبات شیمیایی اسانس ها

اسانس خالص مخلوطی بیش از ۲۰۰ ترکیب هستند به طور معمول شامل ترپن ها یا مشتقات فنیل پروپانیک که در آن ها تفاوت ساختار شیمیایی بین ترکیبات ناچیز است و می توان آن ها را اساساً در دو گروه طبقه بندی نمود:

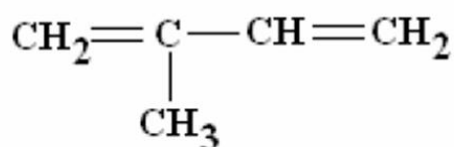
بخش فرار: حدود ۹۰ تا ۹۵ درصد وزن اسانس را روغن تشکیل می دهد که شامل مونوترپن ها، ترپن هیدروکربن ها و مشتقات اکسیژن دار از قبیل آلدهیدهای آلیفاتیک، الکل ها و استرها می باشد.

بخش غیر فرار: ۱ تا ۱۰ درصد روغن را تشکیل می دهند و شامل هیدروکربن ها، اسیدهای چرب، استرول ها، کاروتنوئیدها، واکس و استرها می باشد.

۲-۵-۲-۱- هیدروکربن^۱

اسانس ها ترکیبات شیمیایی هستند که در آن ها هیدروژن و کربن به عنوان بلوک ساختمانی آن ها عمل می کند، عمده ترین هیدروکربن های موجود در ساختمان گیاهان ایزوپرن هستند که دارای ساختار صفحه بعد هستند:

^۱Hydrocarbon



(Isoprene)

شکل ۲-۴ فرمول ساختاری ایزوپرن

۲-۵-۲-۲-ترین ها^۱

در طبیعت به طور وسیعی وجود دارند و در گیاهان به عنوان عمده‌ترین ترکیبات اسانس هستند. ترین ما دارای خاصیت ضد التهاب، ضد عفونی کننده و ضد باکتری هستند. ترین ها از لحاظ ساختار و عملکرد متفاوت طبقه بندی می‌شوند، آن ها از ترکیباتی که دارای ۵ واحد کربن است و ایزوپرن نامیده می‌شود ساخته شده‌اند. فرول مولکولی و ساختمانی ترین ها $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$ است و آن ها بر اساس تعداد واحد ایزوپرن طبقه بندی می‌شوند. مونوترپن (دو واحد ایزوپرن)، سزکوئی ترین (سه واحد ایزوپرن)، دی ترین (چهار واحد ایزوپرن)، تری ترین (شش واحد ایزوپرن) و تتراترپن (هشت واحد ایزوپرن) دارند (Chemical Constituents of Essential oils” from the webpage).

۲-۵-۲-۱-مونوترپن ها^۲ ([C₁₀H₁₆])

دارای خاصیت ضد درد، ضد باکتری، ضد خلط و محرک می‌باشد. عمده‌ترین هیدروکربن‌های غیراشباع بوده و برخی از مشتقات اکسیژن دار آن ها از قبیل الکل‌ها، کتون‌ها و اسیدهای کربوکسیلیک به عنوان مونوترپنوئید (Monoterpenoid) شناخته می‌شوند (Chemical Constituents of Essential oils: from the webpage).

¹ Terpenes

² Monoterpenes

۲-۵-۲-۲-۲- سزکوئیترینها

دارای خاصیت ضد التهاب، آنتی سپتیک، ضد درد و ضد حساسیت می‌باشند. آن‌ها یک گروه بسیار زیاد از متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند و بعضی از آن‌ها به عنوان ترکیبات ضد استرس در نتیجه استرس یا زخم به وجود می‌آیند و ساختار آن‌ها ممکن است به صورت خطی، مونوسیکلک یا بی سیکلیک باشد (Chemical).

(Constituents of Essential oils- from the webpage)

۲-۵-۲-۲-۳- دی‌ترینها^۱

از ویژگی‌های درمانی آن می‌توان به خاصیت ضد قارچ، ضد خلط، متعادل کننده هورمونی و کاهش‌دهنده فشار خون اشاره کرد. از چهار واحد ایزوپرن ساخته شده‌اند و به دلیل وزن مولکولی زیادش نمی‌تواند همراه با اسانس در فرآیند تقطیر جدا شود و به همین دلیل به ندرت در اسانس دیده می‌شود. در حدود ۲۵۰۰ دی‌ترین شناخته شده است که متعلق به ۲۰ ساختار اصلی هستند. هورمون‌های گیاهی ژیرلین و فیتول که به عنوان ذخیره جانبی کلروفیل هستند از دی‌ترین‌ها مشق می‌شوند (Chemical Constituents of Essential oils- from the webpage).

۲-۵-۲-۳- الکلها^۲

از ویژگی‌های آن‌ها می‌توان به آنتی سپتیک، ضد ویروس، ضد باکتری و میکروب کش بودن آن‌ها اشاره کرد. ترکیباتی هستند که دارای گروه هیدروکسیل می‌باشند و به صورت طبیعی و یا در ترکیب با استرها وجود دارند. زمانی که ترپن به یک اتم اکسیژن و یا هیدروژن متصل است نتیجه حاصله یک الکل است و زمانی که ترپن اولیه مونوترپن باشد الکل حاصله مونوترپنول نامیده می‌شود. الکل‌ها یک واکنش خیلی کم و یا ضعیف بر روی پوست و یا بدن دارند و بنابراین امن در نظر گرفته می‌شوند (Chemical Constituents of Essential oils- from the

webpage)

^۱ Diterpenes

^۲ Alcohols

۲-۵-۲-۴-آلدهیدها^۱

از خواص آن ها می توان به ضد قارچ، ضد التهاب، آنتی سپتیک بودن آن ها اشاره کرد. روغن های حاوی آلدهید در درمان کاندیدا و دیگر عفونت های قارچی مؤثر هستند (Chemical Constituents of Essential oils- from the webpage).

۲-۵-۲-۵-اسیدها^۲

معمولاً ضد التهاب هستند. اسیدهای آلی در حالت آزاد خود بطور کلی در مقادیر بسیار کم در اسانس یافت می شوند. اسیدهای گیاهی به عنوان یا اجزا سیستم بافر برای کنترل اسیدیته عمل می کنند (Chemical Constituents of Essential oils- from the webpage).

۲-۵-۲-۶-استرها^۳

از واکنش الکل با اسید تشکیل می شوند. روغن های حاوی استر به علت داشتن اثرات تسکین دهنده و متعادل کننده مورد استفاده قرار می گیرند. از لحاظ پزشکی نیز استرها به عنوان ضد قارچ و آرام بخش شناخته شده اند و متعادل کننده سیستم عصبی نیز می باشند (Chemical Constituents of Essential oils - from the webpage).

۲-۵-۲-۷-کتون ها^۴

محرک رشد سلولی، خلط آوری و ضد زکام بودن از خواص درمانی آن ها می باشد. کتون هایی که در گیاهان یافت می شوند اغلب جهت مشکلات دستگاه تنفس فوقانی استفاده می شوند. اسانس های حاوی کتون جهت بهبود زخم ها و تشکیل بافت های جدید در محل زخم ها مفید می باشند. سمی ترین کتون ها در مریم گلی، افسنتین و درخت

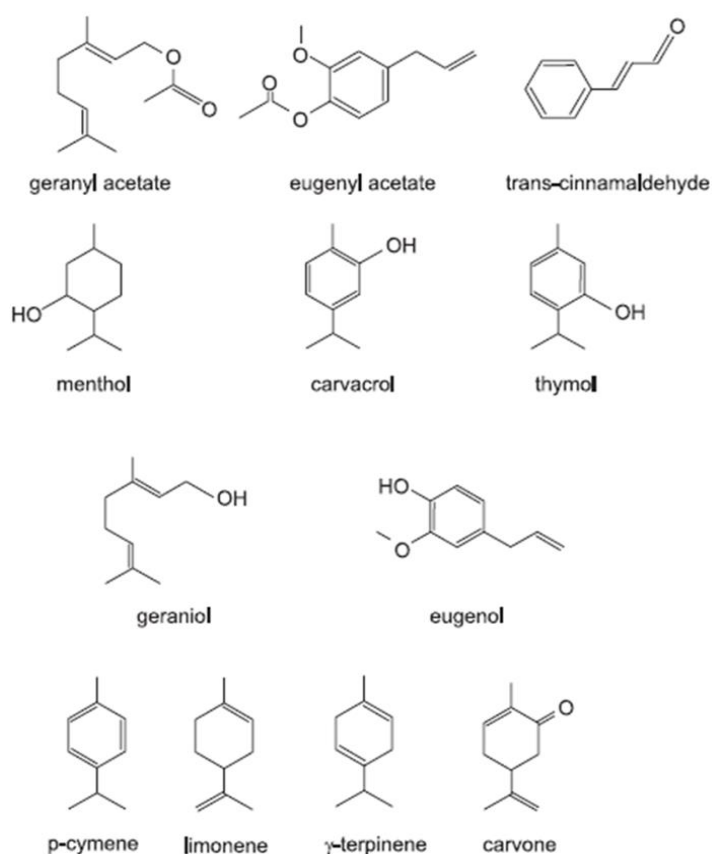
^۱Aldehydes^۲Acids^۳Esters^۴Ketones

زندگی موجود می‌باشد. کتون‌های غیر سمی در روغن یاسمین، روغن رازیانه، روغن نعناع و شوید یافت می‌شوند
(Chemical Constituents of Essential oils - from the webpage).

۲-۵-۸- لاکتون‌ها^۱

دارای ویژگی‌های ضد التهاب، ضد خلط، تب‌بر و ضد آماسم و ورم هستند. لاکتون‌ها بیشتر به خاطر خواص ضد التهابی و موثر خود شناخته شده هستند و احتمالاً به وسیله نقششان در کاهش تولید پروستاگلاندین و نقش خلط-آوری خود ایفا می‌کنند. لاکتون‌ها از لحاظ خواص ضد خلط خود حتی از کتون‌ها هم قوی‌تر می‌باشند (Chemical

Constituents of Essential oils- from the webpage)



شکل ۲-۵ فرمول ساختاری بعضی از اجزای منتخب اسانس‌های روغنی (Eos)

^۱Lactones

۲-۶- روش‌های استخراج اسانس

تلاش‌های اولیه برای استخراج اسانس استفاده از الکل و یک فرآیند تخمیر بود. روشی که در آن روغن از گیاه استخراج می‌شود مهم است زیرا در برخی از فرآیندها از برخی مواد یا حلال‌ها استفاده می‌شود می‌تواند خصوصیات طبیعی یا درمانی آن روغن یا اسانس را از بین ببرد. بعضی از گیاهان و یا اجزای آن به خصوص گل را نباید به روش تقطیر بخار اسانس گیری کرد و دلیل این کار این است که آن‌ها بیش از حد حساس بوده و یا عطر و اسانس آن‌ها را نمی‌توان کامل جدا کرد. روش‌های مختلف اسانس گیری هر کدام در جای خود مهم بوده و می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. برخی از روش‌هایی که برای استخراج اسانس در دسترس هستند در زیر آورده شده‌اند:

۲-۶-۱- فشار سرد^۱:

در این روش با استفاده از فشار سرد برای استخراج اسانس از پوست مرکبات مانند پرتقال، لیمو، ترنج و گریپ فروت استفاده می‌شود. این روش شامل فشار دادن ساده پوست میوه در ۱۲۰ درجه فارنهایت تا استخراج روغن است. پوست از میوه جدا می‌شود و سپس فشرده می‌شود و در نتیجه مخلوطی آبکی از اسانس و مایعی که در زمان پرس از آن خارج می‌شود بدست آید که اگر وجود داشته باشد در حالت اصلی روغن تغییر به وجود می‌آید. آنچه که مهم است این است که روغن بدست آمده با استفاده از این روش عمر نسبتاً کوتاهی دارد و همیشه سعی کنیم که روغن‌هایی را که با استفاده از این روش تولید شده‌اند و از عمر مفید آن‌ها بیش از شش ماه گذشته است را مورد مصرف قرار ندهیم (Making Essential Oils - Methods of Essential Oil).

Extraction: from the webpage)

^۱ Cold Pressing

۲-۶-۲- استخراج با حلال^۱

در این روش یک حلال هیدروکربنی به مواد گیاهی اضافه می‌شود تا به حل شدن اسانس روغنی کمک کند. زمانی که محلول فیلتر می‌شود و به وسیله تقطیر تغلیظ می‌شود، مواد حاوی رزین یا ترکیبی از موم و اسانس باقی می‌ماند. برای استخراج روغن از الکل خالص استفاده می‌شود و در نهایت با تبخیر الکل روغن باقی می‌ماند. این روش به عنوان بهترین روش رای استخراج در نظر گرفته نشده است زیرا احتمال باقی ماندن مقدار کمی از حلال وجود دارد که می‌تواند باعث آلرژی یا تحریک سیستم ایمنی بدن، در موارد دارویی و درمانی بشود (Making Essential).

Oils- Methods of Essential Oil Extraction: from the webpage)

۲-۶-۳- اینفلوریج^۲

این روش راه سنتی و شدید استخراج روغن از گل است. این فرآیند شامل لایه بندی چربی بر گلبرگ‌های گل است در مرحله بعد اسانس روغنی جذب می‌شود و بعد الکل جهت جدا کردن و استخراج اسانس از چربی استفاده می‌شود و در مرحله بعد الکل تبخیر شده و اسانس باقی می‌ماند (Making Essential Oils - Methods of).

Essential Oil Extraction: from the webpage)

۲-۶-۴- تقطیر آبی^۳

تقطیر آبی به عنوان یک فرآیند منسوخ در برخی از کشورهای در حال توسعه برای استخراج اسانس استفاده می‌شود. در نتیجه این فرآیند احتمال سوختن ترکیبات آروماتیک و در نتیجه اسانس با بوی سوخته تولید می‌شود و یا بیش از حد گرم می‌شود. به نظر می‌رسد که تقطیر آبی برای مواد پودری و یا مواد بسیار سفت و سخت نظیر

^۱ Solvent Extraction

^۲ Enfleurage

^۳ Hydro distillation

ریشه یا پوست مناسب است: Making Essential Oils - Methods of Essential Oil Extraction: (from the webpage)

۲-۶-۵- استخراج با CO₂ و یا CO₂ فوق بحرانی

این روش جزء مدرن ترین فن آوری هاست که در آن از دی اکسید کربن به عنوان حلال استفاده می شود و اسانس را از میان سایر مواد گیاهی جدا می کند. فشار پایین استخراج با دی اکسید کربن شامل دی اکسید کربن خنک کننده با دمای ۳۵ و ۵۵ درجه فارنهایت و پمپاژ آن از میان مواد گیاهی با فشاری در حدود 1000 PSI است که تحت این شرایط دی اکسید کربن به مایع تبدیل شده است. در استخراج با CO₂ فوق بحرانی دی اکسید کربن تا ۸۷ درجه فارنهایت حرارت داده می شود و با فشار 8000 PSI از میان مواد گیاهی پمپاژ می شود که در این شرایط دی-اکسید کربن به بخار یا مه تبدیل می شود. با آزاد کردن و برداشتن فشار، دی اکسید کربن به حالت فرار درآمده و اسانس باقی می ماند. نکته مهم در استفاده از این روش استفاده از فشار کم و درجه حرارت پایین است. درجه حرارت بالا، پردازش (فرآوری) سریع و استفاده از حلال ساختار مولکولی آن را تغییر داده و ارزش درمانی اسانس را تغییر داده یا نابود می کند (Making Essential Oils - Methods of Essential Oil Extraction: from the webpage)

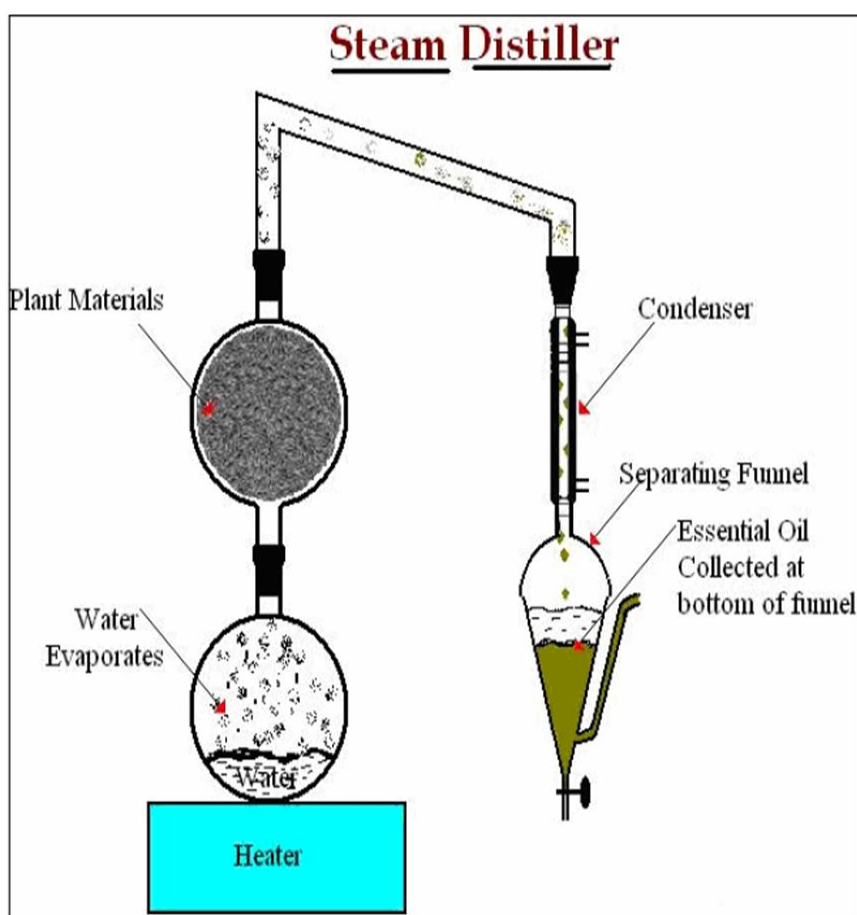
۲-۶-۶- تقطیر توربینی^۱

توربو تقطیر مناسب برای استخراج مواد سخت یا مواد درشت دانه مانند پوست، ریشه و دانه است. در این روش گیاهان در آب خیسانده می شوند و بخار آب از میان مخلوط آب و گیاه به گردش در می آید. در تمامی مراحل کار آب به طور مداوم بازیافت شده و دوباره مورد استفاده قرار می گیرد (Making Essential Oils - Methods of Essential Oil Extraction: from the webpage)

^۱ Turbo Distillation Extraction

۲-۶-۷- تقطیر با بخار^۲

رایج‌ترین روش است که در آن اسانس گیاه با استفاده از تکنیک تقطیر استخراج می‌شود. بخار حاوی اسانس جمع می‌شود و پس از گذشت از منطقه خنک، جمع و متراکم می‌شود. سپس مخلوط آب و اسانس جدا می‌شود. از آنجا که گیاهان دارای مقادیر بسیار کمی اسانس هستند، مقادیر زیادی گیاه برای به دست آوردن اسانس آن‌ها مورد نیاز است (Making Essential Oils - Methods of Essential Oil Extraction: from the web page).



شکل ۲-۶-۲ دیاگرام مربوط به تقطیر با بخار

^۲Steam Distillation



شکل ۲-۷ دیاگرام مربوط به تقطیر با آب

۲-۷- تاریخچه استفاده از اسانس

اگرچه ادویه‌جات برای عطر، بو و خواص نگه دارنده‌شان از ایام باستان مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند اما تنها اسانس سقر توسط تاریخ دانان رومی و یونانی اشاره شده است. تبخیر یک روش تولید اسانس بوده که برای اولین بار در شرق (مصر، هند و ایران) در ۲۰۰۰ سال قبل و در قرن ۹ میلادی توسط اعراب مورد استفاده قرار گرفته است. اولین نوشته معتبر که تبخیر اسانس را نقل کرده است توسط Villonval (یک فیزیکدان کاتالان) توصیف شده است. در قرن ۱۳ میلادی اسانس‌ها توسط داروسازان شناخته شده و اثرات دارویی آن‌ها در فارماکوپه‌ها توصیف شد. اما استفاده آن‌ها به طور گسترده تا قرن ۱۶ میلادی در اروپا مشخص نشد. مقالات مجزا در آن قرن توسط دو فیزیکدان استراسبورگی، برانشویگ و رایف، تقطیر و کاربرد اسانس‌ها را ذکر کردند. تعداد کمی از اسانس‌ها مثل تربانتین، چوب سرو، رزماری، اسطوخودوس، میخک، پوست جوز، درخت جوز، بادیان رومی و دارچین مطابق با نظر فیزیکدان فرانسوی Duchesne در قرن ۱۷ میلادی تهیه شدند. استفاده از روغن درخت چای برای اهداف پزشکی پس از مستعمره شدن استرالیا در قرن ۱۸ میلادی ثبت شده است. اگرچه عموماً توسط بومیان توسط بومیان استرالیایی قبلاً استفاده می‌شده است. اولین آزمایش که خواص ضد میکروبی اسانس را بیان کرد توسط Dela croix در ۱۸۸۱ میلادی انجام شد. هرچند در طول قرن ۱۹ و ۲۰ میلادی کاربرد اسانس برای دارو در اولویت ثانویه پس از استفاده برای عطر و طعم قرار گرفت (Burt, 2004).

۲-۸- کاربرد های امروزی اسانس‌ها

بیشترین کاربرد امروزی اسانس‌ها در اتحادیه اروپا در غذا (به عنوان طعم دهنده)، عطرها (خوشبو کننده و افترشیو) و داروها (برای خواص عملی شان) می‌باشد. ترکیبات اختصاصی اسانس‌ها که به عنوان طعم‌دهنده غذایی استفاده می‌شوند، یا از مواد گیاهی استخراج می‌شوند به صورت سنتتیک تولید می‌شوند. اسانس‌ها و ترکیباتشان به عنوان مواد ضد میکروبی، هم چنین در تولیدات تجاری گوناگون به عنوان روزنه گیرهای کانال‌های ریشه دندان، آنتی سبتیک‌ها (گندزداها) و تزریق مکمل برای دوران شیردهی بکار می‌روند. تقریباً تعداد کمی نگه دارنده حاوی

اسانس‌ها به صورت تجاری در دسترس می‌باشند. DMC بر پایه طبیعی، یک نوع نگه دارنده غذایی تولید شده توسط DOMCA S.A, Alhedin, Granada, Spain و شامل ۵۰ درصد اسانس رزماری، Saga، لیمو و ۵۰ درصد گلیسرول می‌شود (Burt, 2004).

Protecta one و Protecta two مخلوط عصاره های گیاهی تولید شده توسط شرکت باواریا در آمریکا است و عموماً به عنوان یک افزودنی غذایی سالم (GRAS) در آمریکا طبقه بندی می‌شود. اگرچه ترکیبات دقیق توسط شرکت سازنده معرفی نمی‌شوند اما احتمالاً عصاره‌ها شامل یک یا چند نوع اسانس می‌باشند و قابل حل در محلول‌ها سیترات سدیم و کلرید سدیم می‌باشند. تأثیرات فیزیولوژیک بیشتر اسانس‌ها، آن‌ها را به طور وسیع در تولیدات مختلف قابل استفاده می‌کند (Burt, 2004).

۹-۲- آزمایشات فعالیت ضد میکروبی در سیستم‌های غذایی

اگرچه همان طور که قبلاً ذکر شد تعداد کمی مواد نگه دارنده مواد غذایی حاوی اسانس‌ها به صورت تجاری موجود است. تا اوایل ۱۹۹۰ مطالعات خیلی کمی در خصوص فعالیت اسانس‌ها در غذاها منتشر شده بود، از آن زمان تعداد خوبی از آزمایشات با اسانس‌ها در مواد غذایی انجام گرفت. یک بازنگری مطالعات گذشته در مقالات در خصوص فعالیت ضد میکروبی در خصوص فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها در مواد غذایی آورده شده است. هر چند اسانس‌ها در شرایط آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی خوبی دارند، اما برای بروز همان اثر در غذا نیاز به غلظت بالاتر می‌باشد. نسبت‌هایی که ثبت شده، تقریباً ۲ برابر در شیر کم چرب، ۱۰ برابر در سوسیس کبد خوک، ۵۰ برابر در سوپ، ۲۵ تا ۱۰۰ برابر در پنیرهای نرم می‌باشد. یک استثنا برای این پدیده باکتری آئروموناس هیدروفیلا که هیچ افزایشی در غلظت اسانس برای جلوگیری از رشد این گونه در خوک و کاهو در مقایسه با آزمایشات در شرایط آزمایشگاهی نیاز نمی‌باشد. چندین مطالعه در خصوص اثر مواد غذایی یا مقاومت میکروبی به اسانس‌ها ثبت شده‌اند کیفیت و مکانیسم آن مشخص نشده است، ولی پیشنهاداتی برای علت‌های ممکن ارائه شده است. مواد غذایی قابل دسترس عمده در مواد غذایی به نسبت محیط‌های کشت آزمایشگاهی، ممکن است باعث توانایی باکتری‌ها برای اصلاح سریع‌تر سلول‌های آسیب دیده شود. نه تنها عوامل درونی غذا (چربی، پروتئین، مقدار آب، آنتی اکسیدان‌ها،

نگه دارنده ها، Ph، نمک و دیگر افزودنی‌ها) می‌توانند در حساسیت باکتری موثر باشند، بلکه عوامل خارجی (دما، بسته بندی در خلأ، گاز یا هوا و ویژگی میکروارگانیسم‌ها) می‌توانند در حساسیت باکتری موثر باشند. در Ph پایین هیدروفوبیسیته یک اسانس افزایش می‌یابد و باعث می‌شد تا راحت تر در چربی‌های غشاء سلول باکتری هدف حل شود. معمولاً گمان می‌شود که سطوح بالای چربی یا پروتئین در مواد غذایی باعث حفاظت باکتری در برابر اسانس در برابر بعضی موارد شود. برای مثال اگر اسانس در فاز چربی غذا حل شود، نسبتاً کمتر در دسترس خواهد بود تا بر روی باکتری‌های موجود در فاز آبی اثر کند. پیشنهاد دیگر این است که مقدار آب موجود در ماده غذایی به نسبت محیط‌های کشت آزمایشگاهی، ممکن است مانع پیشرفت عوامل ضد باکتری برای قسمت‌های هدف در سلول باکتری شود. روغن نعناع^۱ در سالاد پت و ماهی رو^۲، محصولات با چربی بالا اثر آنتی باکتریال کمتری بر روی لیستریا مونوسیتوژنز و سالمونلا انتریدیس دارد، در حالی که در سالاد ماست و خیار (چربی کم) همان اسانس بیشتر موثر است. اگرچه تأثیرات بهترش در سالاد ماست و خیار ممکن است که تا حد کمی به Ph پایین نسبت داده شود (۴/۳ در قیاس با ۶/۸ در پت) سالاد ماهی رو نیز یک Ph پایین دارد (۴/۹). به نظر می‌رسد که این مشخصه درصد چربی به نسبت Ph روی اثر ضد باکتری اسانس‌ها تأثیر بیشتری نشان دهد (Burt, 2004).

واکنش بین کارواکرول یک ترکیب فنولیک متفاوت اسانس، و پروتئین‌ها در شیر که به عنوان یک عامل محدود کننده در فعالیت ضد باکتری در برابر باسیلوس سرئوس در شیر عمل کرده است. مقدار پروتئین در پنیر کم چرب آبی، به عنوان یک عامل ممانعت کننده در فعالیت روغن میخک بر روی سالمونلا انتریدیس عمل کرده است. کربوهیدرات‌ها در غذا همانند چربی و پروتئین نمی‌توانند از باکتری‌ها در مقابل اسانس‌ها محافظت کنند. میزان آب یا نمک بالا به عمل اسانس‌ها کمک می‌کند. ساختمان فیزیکی یک غذا ممکن است باعث محدودیت فعالیت ضد باکتری اسانس شود. یک مطالعه مقایسه نسبت کارایی روغن پونه کوهی^۳ بر روی سالمونلا تیفی موریوم در محیط مایع و ژل ژلاتین مشخص کرد که ماتریکس ژل به طور واضحی اثر بازدارندگی اسانس را کاهش داد. این مسئله به علت محدودیت پخش اسانس به وسیله ساختمان ماتریکس ژل حتمی می‌باشد. MIC برای یک اسانس مشخص روی یک باکتری خاص در محیط براث معمولاً اندکی پایین‌تر از آگار می‌باشد. تحقیقات در خصوص مشخصات رشد لیستریا مونوسیتوژنز و یرسینیا انتروکولیتیکا در امولسیون روغن در آب نشان داد که بسته به

^۱ mint oil^۲ fish roe^۳ Oregano

میانگین سایز قطره امولسیون، باکتری می‌تواند در فیلم‌ها، در کلنی‌ها یا سلول‌های پلانکتونیک رشد کند. مشخص شده که رشد کلنی محدود به پخش اکسیژن می‌شود و سلول‌های واقع در کلنی ممکن است با مقدار معینی از سلول‌های خارجی سوبسترا در امولسیون محافظت شوند. اگر قطرات روغن در یک امولسیون غذایی سایز مشخص داشته باشند. ممکن است بتوانند مانع از عمل اسانس‌ها بر رشد باکتری و محافظت و محافظت آن‌ها در کلنی‌ها شوند (Burt, 2004).

۲-۹-۱- گوشت و فرآورده های آن

اسانس‌های اوژنول، گشنیز، میخک، پونه کوهی و آویشن در سطوح ۵ تا ۲۰ میکرو لیتر بر گرم در برابر باکتری‌های لیستریا مونوسایتوزنز، آئروموناس هیدروفیلا و سایر عوامل فساد خودبخودی محصولات گوشت و فلور طبیعی آن‌ها موثر واقع شد، درحالی‌که خردل، نعناع و مریم گلی به میزان کمتری موثر بوده یا بی‌اثر بودند. به نظر می‌رسد که محتوای چربی بالا عمل اسانس‌های روغنی را در محصولات گوشتی کاهش می‌دهد. به عنوان مثال اسانس نعناع و گشنیز در موادی که دارای سطوح بالایی از چربی (۳۵ تا ۴۰ درصد چربی) از قبیل ژامبون‌های پوشش داده شده با روغن کانولا موثر واقع نشد (Ultee et al, 2000).

فعالیت اسانس پونه نیز بر علیه اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم در بسته‌های گوشت بسته بندی شده در خلأ مورد مطالعه قرار گرفته است. غلظت‌های ۰/۴ میکرو لیتر بر گرم اسانس پونه تا حدود زیادی مانع از رشد اسپور ها و یا به تأخیر انداختن رشد آن‌ها می‌شود. با این حال استفاده از سطوح پایین نیتريت سدیم که باعث به تأخیر انداختن رشد و تورم باکتری می‌شود در صورتی که به طور همزمان از نیتريت سدیم و اسانس پونه استفاده شود کاربرد و اثر آن‌ها در جلوگیری از رشد باکتری‌ها به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. البته تأخیر در رشد به مقادیر اسپور تلقیح شده دارد و در مقادیر ۳۰۰ اسپور در گرم، تأخیر بیشتری نسبت به ۳۰۰۰ اسپور در گرم نشان می‌دهد (Skandamis and Nychas, 2001 and Gill et al, 2002).

۲-۹-۲- ماهی

ماهی‌هایی نیز که مانند محصولات گوشتی دارای محتوای چربی بالایی هستند، اثر آنتی باکتریال اسانس‌ها را کاهش می‌دهند. به عنوان مثال غلظت‌های ۰/۵ میکرو لیتر بر گرم از اسانس پونه کوهی بیشتر روی فوتو باکتریوم فسفریوم در فیله ماهی به میزان بیشتری نسبت به ماهی سالمون موثر است، زیرا سالمون دارای محتوی چربی بیشتری است. پونه کوهی نیز نسبت به روغن نعناع با انجام دو آزمایش به صورت تجربی و استفاده از غلظت‌های مشابه ۵ تا ۲۰ میکرو لیتر بر گرم مؤثرتر واقع شد (lemay et al, 2002 and Harpz et al, 2003).

۲-۹-۳- محصولات شیری

روغن نعناع در غلظت‌های ۵ تا ۲۰ میکرو لیتر در گرم در برابر سالمونلا انتری‌دیس در ماست کم چرب و سالاد خیار موثر واقع شد. روغن نعناع هم چنین در غلظت‌های ۰/۵ تا ۵ میکرو لیتر در گرم مانع از رشد گونه‌های کشت آغازگر در ماست می‌شود اما دارچین، هل و میخک در این مورد بسیار مؤثرتر واقع می‌شوند (Mejlholm and Dalgaard, 2002).

۲-۹-۴- سبزیجات

سبزیجات بطور کلی به دلیل داشتن محتوی چربی پایین، اثرات اسانس و عصاره‌ها در مورد آن‌ها می‌تواند نتایج موفقیت‌آمیزتری به دنبال داشته باشد به نظر می‌رسد که در غذاهای گیاهی درست مانند محصولات گوشتی، فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های روغنی از طریق کاهش دمای نگه داری افزایش اسیدیته در غذا مؤثرتر واقع شود. اکثر اسانس‌ها و ترکیباتشان که بر روی سبزیجات مختلف آزمایش شده‌اند علیه فلور طبیعی و پاتوژن‌های منتقله از راه مواد غذایی در سطوح ۰/۱ تا ۱۰ میکرو لیتر بر گرم از طرق شستشوی آن‌ها در آب موثر باشد. روغن پونه کوهی در غلظت‌های ۷ تا ۲۱ میکرو لیتر بر گرم مانع از رشد E.coli O157:H7 می‌شود و نیز کاهش جمعیت آن‌ها در سالاد

بادمجان نسبت به نمونه های شاهد می شود (Seneiirathne et al, 2006).

۲-۹-۵- برنج

روغن و اسانس مریم گلی در غلظت های ۰/۲ تا ۰/۵ میکرولیتر بر گرم زمانی در برابر باسیلوس سرئوس در برنج استفاده شد بی اثر بود اما زمانی که از غلظت های ۰/۱۵ تا ۰/۷۵ استفاده شد در کاهش جمعیت نهایی و طولیل نمودن فاز تأخیر در مقایسه با یک گروه کنترل موثر بود (Tassou et al, 1995).

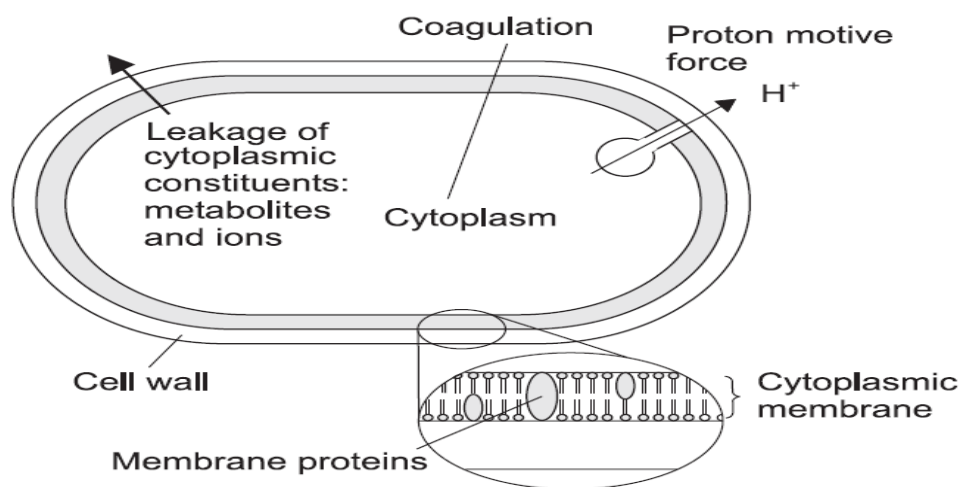
۲-۹-۶- میوه ها

کاواکرول^۱ و سینامالدهید در کاهش فلور طبیعی کیوی زمانی که از غلظت های ۰/۱۵ میکرو لیتر بر گرم آن ها استفاده می شود بسیار موثر بودند اما در برابر شکرک خربزه به میزان کمتری موثر بودند. البته این امکان وجود دارد که این تفاوت با تفاوت بین Ph میوه ها که در کیوی ۳/۲ تا ۳/۶ بوده ولی در خربزه بین ۵/۴ تا ۵/۵ است، قابل توجیه باشد. زیرا همان طور که قبلاً ذکر شد اثر آنتی باکتریال اسانس های روغنی در Ph های پایین به میزان قابل توجهی بهبود می یابد (Singh et al, 2002).

۲-۱۰- طرز عمل فعالیت ضد باکتری

با در نظر گرفتن تعداد زیاد گروه های مختلف ترکیبات شیمیایی حاضر در اسانس ها، بیشترین احتمال این است که فعالیت ضد باکتری آن ها قابل استناد به یک مکانیسم خاص نیست، اما چند هدف در سلول وجود دارد. محل ها یا مکانیسم ها در سلول باکتری در شکل زیر مشخص شده است.

^۱ Carvacrol



شکل ۲-۸ محل و مکانیسم فعالیت اسانس‌ها در سلول باکتری

این مکانیسم‌ها نه تنها هدف‌ها را جدا می‌کنند، تعدادی تحت تأثیر دیگر مکانیسم‌های هدف‌گذاری شده هستند. یک مشخصه مهم اسانس‌ها و ترکیباتشان آب‌گریزی آن‌هاست که آن‌ها را قادر می‌کند تا با جدا کردن لیپیدهای دیواره سلولی و میتوکندری باکتریایی، ساختمانشان را مختل کند و نفوذپذیری بیشتر آن‌ها را آماده کند. تراوش یون‌ها و دیگر محتویات سلولی می‌تواند رخ دهد. اگرچه مقدار معینی تراوش از سلول‌های باکتریایی بدون کاهش زیست‌پذیری ممکن است تحمل شود، اما کاهش وسیع مقادیر سلولی یا خروج مولکول‌های بحرانی و یون‌ها منجر به مرگ خواهد شد. از مطالعات با روغن چای و اشرشیاکالای مدارکی وجود دارد که مرگ سلول ممکن است قبل از زوال سلول رخ دهد. عموماً اسانس‌های واجد شرایط از نظر خواص ضد باکتری در برابر پاتوژن‌های با منشأ غذایی حاوی درصد بالایی ترکیبات فنولیک مانند کارواکرول، اتوگونول (۲-متوکسی-۴-پروپنیل) فنول و تیمول می‌باشند. این معقول به نظر می‌رسد که مکانیسم عمل آن‌ها مشابه دیگر فنولیک‌ها باشد (Ultee et al, 2000).

and Roller and Seedhar, 2000)

به طور کلی اختلال در غشای سیتوپلاسمی، اختلال در نیروی محرکه پروتون (PMF) جریان الکترونی، حمل و نقل فعال و انعقاد محتویات سلولی مدنظر می‌باشد. ساختمان شیمیایی منحصر به فرد ترکیبات شیمیایی اسانس بر حالت دقیق عمل و فعالیت ضد باکتریایی اثر می‌گذارند. اهمیت وجود گروه‌های هیدروکسیل در ترکیبات فنولیک مانند کارواکرول و تیمول تایید شده است. موقعیت نسبی گروه فنولیک با تأثیر بر درجه فعالیت ضد باکتریایی به

شدت ظاهر نمی‌شود. برای مثال عمل تیمول در برابر باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژنزا در قیاس با کارواکرول ظاهر می‌شود. با این حال در یک مطالعه عمل متفاوت کارواکرول و تیمول روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی یافت شد. اهمیت حلقه فنل (بی ثبات کننده الکترون‌ها) به تنهایی عدم فعالیت منتول در قیاس با کارواکرول را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای دیگر اضافه کردن یک قسمت استات به مولکول با افزایش فعالیت ضد باکتری همراه بود. گرانیل استات به نسبت گرانیول در برابر یک رنج از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بیشتر فعال بود. از آنجا که ترکیبات غیر فنولیک اسانس‌ها اهمیت دارند نوع گروه آلکیل نیز در فعالیت آن‌ها تأثیر می‌گذارد (Carson et al, 2002 and Pol et al, 2001).

ترکیبات اسانس هم چنین نشان دادند که بر روی پروتئین‌های سلولی جاسازی شده در لایه سیتوپلاسمی عمل می‌کنند. آنزیم‌ها مانند ATPases با تعیین در لایه سیتوپلاسم و مجاورت با مولکول‌های لیپید شناخته می‌شوند. دو مکانیسم ممکن پیشنهاد شده است که به موجب آن هیدروکربن‌های حلقوی روی این می‌توانند عمل کنند. مولکول‌های هیدروکربن‌های چربی دوست می‌توانند در چربی دو لایه انباشته شده و عمل چربی-پروتئین را مختل کنند و از طرف دیگر واکنش مستقیم ترکیبات چربی دوست با قسمت‌های آب دوست پروتئین ممکن است صورت بگیرد. مشخص شده که تعدادی از اسانس‌ها باعث تحریک رشد شبه مسیل در مخمرهای حقیقی می‌شوند (Dorman and Deans, 2000).

۲-۱۱- حساسیت ارگانوسم‌های گرم مثبت و گرم منفی

بر اساس مطالعات و تحقیقات انجام شده، عمل تمام اسانس‌ها بر ارگانوسم‌های عامل فساد مواد غذایی و پاتوژن‌های بیماری‌زای مواد غذایی نشان می‌دهد که اسانس‌ها اندکی بیشتر بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی موثرند. انتظار می‌رود که ارگانوسم‌های گرم منفی کمتر به عمل آنتی باکتریال‌ها حساس باشند، که این در نتیجه داشتن یک لایه بیرونی در اطراف دیواره سلولی بوده که این لایه مانع پخش ترکیبات آب دوست به واسطه پوشش لیپوساکاریدیش می‌شود. اکثر مطالعات استنتاج کرده‌اند که باکتری‌های گرم مثبت حساس‌ترند. آئروموناس هیدروفیلا (گرم منفی) نشان داده که یکی از حساس‌ترین گونه‌هاست. در مطالعه اسانس

نعناع فلفلی^۱ وقتی تراموسالاتا^۲ و تراتزیک^۳، اشتهاآورهای یونانی اضافه شدند یک کاهش در مقدار شمارش زنده سالمونلا انتریدیس نسبت به لیستریا مونوسیتوزنز حاصل شد. در دیگر مطالعات هیچ اختلافی بین گرم منفی ها و گرم مثبت ها بعد از ۲۴ ساعت مشاهده نشد، اما اثر بازدارندگی بعد از ۴۸ ساعت بر گرم منفی ها بیشتر از گرم مثبت ها بود. در یک آزمایش ۵۰ اسانس تجاری در دسترس بر روی ۲۵ جنس، هیچ مدرکی برای اختلاف در حساسیت باکتری های گرم مثبت و گرم منفی یافت نشد. در مطالعه ی بعدی که همان روش آزمایش و همان باکتری ها مورد آزمایش قرار گرفتند و ظاهراً از اسانس تازه تقطیر شده استفاده شده بود باکتری های گرم مثبت در واقع حساسیت بیشتری نسبت به دو اسانس داشته و حساسیت به چهار اسانس دیگر با گونه های گرم منفی مساوی است. این منطقی به نظر می رسد که ترکیبات منحصر به فرد اسانس ها درجات مختلف بازدارندگی فعالیت در برابر باکتری های گرم مثبت و منفی دارند و معلوم می شود که ترکیبات شیمیایی اسانس ها از گونه های گیاه خاص می تواند بسته به منشأ جغرافیایی و دوره برداشت متفاوت باشد. بنابراین امکان دارد که تفاوت در ترکیبات بین بچ های اسانس ها، به علت اختلاف در درجه حساسیت باکتری های گرم منفی و گرم مثبت معنی دار باشد. باکتری های گرم منفی سودوموناس به خصوص سودوموناس آئروژینوزا، کمترین حساسیت به عمل اسانس نشان داد (Burt, 2004).

۲-۱۲- سینرژیسم و آنتاگونیسم بین ترکیبات اسانس

فعالیت ذاتی یک روغن می تواند مربوط به ساختمان شیمیایی ترکیبات، مقادیر نسبی آن ها در ترکیب و ارتباط بین آن ها باشد. در افزودنی های مشاهده شده است وقتی افزودنی ها ترکیب می شوند اثرش برابر است با مجموع اثرات فردی آنتاگونیسم وقتی مشاهده می شود که اثرات یک یا هر دو ترکیب زمانی که آن ها با هم بکار می روند کمتر از وقتی باشد که آن ها به صورت تک تک مورد استفاده قرار می گیرند. سینرژیسم هم زمانی مشاهده می شود که اثر مواد ترکیب شده بیشتر از مجموع اثرات فردی یک ترکیب باشد. تعدادی از مطالعات به این نتیجه رسیدند که تمام اسانس ها فعالیت ضد باکتری بزرگ تری نسبت به مخلوط اصلی ترکیبشان دارند، و اعتقاد بر این است که ترکیبات

^۱Mentha piperita

^۲Taromosalata

^۳Tzatziki

جزئی برای فعالیت ضد باکتری مهم‌اند و ممکن است که یک اثر سینرژیستی یا اثر قوی داشته باشند. اسانس‌های سیلانتر^۱، گشنیز^۲، شوید^۳ و اکالیپتوس^۴ هر کدام شامل چندین ترکیب هستند و زمانی که با هم بکار می‌روند در مجموع دارای اثرات یا آنتاگونیستی بودند. یک مخلوط سینمالدهید و اوژنول به ترتیب در ۲۵۰ میکروگرم در لیتر و ۵۰۰ میکروگرم در لیتر کاملاً مانع رشد گونه‌های استافیلوکوکوس، میکروکوکوس، باسیلوس و انترو باکتر برای بیشتر از ۳۰ روز گردیدند، در حالی که ترکیبات مورد نظر به طور مجزا نتوانستند مانع رشد بشوند (Nychas, 1995).

۲-۱۳- سینرژیسم و آنتاگونیسم بین ترکیبات اسانس و نگه دارنده های مواد غذایی

تعدادی از سینرژیست ها به طور بالقوه برای استفاده همراه با اسانس ها پیشنهاد شده است که عبارتند از: Ph پایین، فعالیت آبی کم، شلات کننده‌ها، فشار اکسیژن پایین، گرمای خفیف و بالا. ولی تمام این‌ها در مواد غذایی تحقیق نشده است و قسمت دیگر مطالعات می‌تواند روی اثر اسانس یا ترکیباتشان با بعضی از افزودنی‌های غذایی از قبیل: نمک طعام، نیتريت سدیم، نایسین و یا استفاده از تکنیک‌های نگه داری مواد غذایی از قبیل: فرایند حرارتی ملایم، فشار هیدرو استاتیک و یا بسته بندی در خلأ می‌باشد (Carson et al, 2002).

کلرید سدیم (نمک طعام) در شرایط مختلف با اسانس یا ترکیباتشان یک سینرژیست یا آنتاگونیست عمل کرده است. سینرژیست بین نمک طعام و روغن نعناع بر علیه سالمونلا انتریدیس و لیستریا مونو سایتوژنز ثبت شده است. ترکیب ۲ یا ۳ درصد نمک طعام و نیم درصد پودر میخک (شامل اوژنول و استات اوژنول) در عصاره ماهیچه ماکرل کاملاً از رشد و تولید هیستامین توسط انتروباکتر آئروژنز جلوگیری می‌کند. مکانیسم پیشنهاد شده برای این عمل این است که نمک طعام نفوذ پذیری سلولی را افزایش می‌دهد و با عمل آنزیم‌های خارج سلولی مانع رشد می‌شود. اثرات آنتاگونیستی نمک طعام با کارواکرول و p-cymene بر علیه باسیلوس سرئوس در برنج یافت شد با اینکه کارواکرول و p-cymene با هم سینرژیست هستند ولی با افزودن نمک (۱/۲۵ گرم برای هر لیتر برنج) کاهش

^۱ cilantro

^۲ coriander

^۳ dill

^۴ Eucalyptus

یافت. در همان مطالعه اثر سینرژی با کارواکرول نشان داد، هرچند این سینرژی با حضور نمک طعام بطور کلی از بین نرفت ولی افزودن نمک به مقدار ۴ درصد وزنی حجمی در آگار نمی تواند فعالیت ضد باکتری سینامالدهید را بر علیه گرم مثبت و گرم منفی بهبود دهد (Moleyer and Narasimhan, 1992).

ترکیب اسانس پونه کوهی با نیتريت سدیم به جهت تأثیرش روی رشد و تولید توکسین کلستریدیوم بوتولینوم (ترکیبی از نوع A و B و C) آزمایش شده است. روغن پونه کوهی با نیتريت در بازدارندگی رشد در محیط برات به صورت سینرژیست عمل کرده است. در حالی که روغن پونه کوهی با غلظت ۴۰۰ ppm هیچ اثر بازدارندگی معنی داری بر رشد نداشت. مکانیسم سینرژیسم پیشنهادی اسانس پونه کوهی این است که تعداد اسپورهای جوانه-زده ای را می کاهد که نتیجه مهار رشد اسپورها توسط نیتريت سدیم هستند (Burt, 2004). کاربرد همزمان نایسین (۰/۱۵ میکروگرم بر لیتر) و کارواکرول یا تیمول (۴۵ میکروگرم بر لیتر) باعث کاهش زیادتر در مقادیر زنده نژادهای باسیلوس سرئوس نسبت به زمانی که باکتری ها به تنهایی به کار گرفتند شد. ماکزیمم کاهش زنده ماندن در سلول هایی به دست آمد که قبلاً حرارت ۴۵ درجه را تجربه کرده بودند (۵ دقیقه برای سلول ها در فاز رشد و ۴۰ دقیقه برای سلول ها در فاز ثابت) (Karatzas et al, 2000).

مشخص شد که کاروان نه تنها حساسیت سلول های رویشی باسیلوس سرئوس را به PEF (میدان های الکتریکی پالسی) افزایش می دهد، بلکه حساسیت اسپورهائشان را به نایسین یا PEF افزایش می دهد. در $Ph=7$ عمل سینرژیستی نایسین و کارواکرول در ۳۰ درجه سلسیوس به طور معنی داری بیشتر از ۸ درجه سلسیوس بود، که نشان می دهد افزایش تغییرات دما در نفوذ پذیری لایه سیتوپلاسمی موثر است. قبلاً فرض شده بود که کارواکرول ممکن است تعداد، اندازه یا طول عمر منافذ به وجود آمده توسط نایسین را در لایه سلول افزایش دهد ولی بعداً مشخص شد که این طور نیست. مکانیسم ممکن است باعث اتلاف پتانسیل ممبران و کاهش گرادیان Ph و ATP خارج سلولی شود. تأثیر ترکیب کارون^۱ در غلظت ۵ میلی مول بر لیتر و عملیات حرارتی ملایم (۴۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه) روی سلول های در حال رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز رشد کرده در ۸ درجه به صورت لگاریتمی مطالعه شده است. ثابت شد که هر فرآیند به طور جداگانه تأثیری در کاهش زنده ماندن باکتری ندارد اما وقتی آن ها باهم ترکیب شدند در تعداد سلول های زنده یک کاهش ۱/۳ لگاریتمی ثبت شد. سلول های رشد کرده

^۱ Carvone

در ۳۵ یا ۴۵ درجه به همان عملیات ترکیبی حساس نبودند. محققین فرض کردند که ترکیبات فسفولیپید لایه سیتوپلاسم سلول‌های رشد کرده در ۸ درجه سلسیوس به علت داشتن سیالیت و نوع عملشان در دمای پایین، واجد شرایط غیر اشباعی بیشتری هستند. این میزان غیر اشباعیت بالا باعث می‌شود که لایه های این سلول‌ها در ۴۵ درجه سیالیت بیشتری نسبت به سلول‌هایی که در همین دما رشد کرده‌اند داشته باشند (Burt, 2004).

مشخص شده که تیمول و کارواکرول با فشار هیدرو استاتیک بالا یک اثر سینرژیستی دارند. تعداد سلول‌های زنده لیستریا مونو سائتوزنر که در فاز لگاریتمی کاهش یافت، با فرآیند ترکیب شده با ۳۰۰ MPa فشار هیدرو استاتیک و ۳ میلی مول بر لیتر تیمول یا کارواکرول بیشتر بود نسبت به حالتی که هر فرآیند به طور مجزا انجام گرفت. از آنجایی که باور بر این است که فشار هیدرو استاتیک بالا باعث نابودی لایه سلول می‌شود می‌توان نتیجه گرفت که این مکانیسم مشترک اساس سینرژیسم مشاهده شده است (Carson et al, 2002).

فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها هم چنین می‌تواند توسط میزان اکسیژن در دسترس تحت تأثیر قرار بگیرد. این می‌تواند به این علت بشود که زمانی که اکسیژن کم است تغییرات اکسیداتیو کمتر در اسانس‌ها رخ می‌دهد یا اینکه سلول‌های باکتری‌ها انرژی‌شان را از طریق متابولیسم غیر هوازی کسب می‌کنند به فعالیت توکسیک اسانس‌ها بیشتر حساس می‌شوند. فعالیت ضد باکتری اسانس‌های پونه کوهی و آویشن معمولاً در اکسیژن پایین بر علیه سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس افزایش می‌یابد. استفاده از بسته بندی و وکیوم در ترکیب با اسانس پونه کوهی، یک اثر سینرژیستی روی بازدارندگی لیستریا مونوسائتوزنر و فلور فاسد کننده در گوشت دارد. مشخص شد که اسانس پونه کوهی در گوشت قیমে و بسته بندی شده با اتمسفر اصلاح شده (۴۰ درصد دی اکسید کربن، ۳۰ درصد نیتروژن و ۳۰ درصد اکسیژن) در قیاس با گوشت بسته بندی شده با اتمسفر معمولی رشد میکروبی را به تأخیر می‌اندازد و شمارش نهایی میکروارگانیسم‌های عامل فساد را کاهش می‌دهد (Ultee et al, 2000).

فصل سوم

مواد و روش ها

۳-۱- مقدمه

در این فصل به بررسی مواد و روش انجام آزمایشات مورد استفاده در انجام طرح مورد نظر می پردازیم و هر یک از آن ها بطور جداگانه توضیح خواهیم داد.

۳-۲- نوع مطالعه

پایه (تجربی): بر اساس مطالعات آزمایشگاهی

۳-۳- جمع آوری و آماده سازی گیاه

به علت شرایط زمانی انجام پایان نامه، گیاه کهلیک اوتی از عطاری های شهرستان تبریز بصورت خشک شده و کامل تهیه شد و سپس نام علمی توسط هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تایید گردید.

۳-۴- تهیه اسانس

جهت تهیه اسانس گیاه کهلیک اوتی، ۲۰۰ گرم گیاه خشک را خرد و آسیاب و سپس با استفاده از یک دستگاه کلونجر اسانس روغنی و فرار گیاه به روش تقطیر با آب استخراج گردید. اسانس بدست آمده به کمک سولفات سدیم خشک، آبگیری و پس از عبور از میکروفیلتر $0.45\mu\text{m}$ در ظرف شیشه ای تیره به دور از نور خورشید در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان شناسایی و تعیین ترکیبات شیمیایی، تعیین خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی نگه داری شد (Sefidkon and Rahimi Bidgoli, 2002).

۳-۵- تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه کهلیک اوتی

مواد و وسایل لازم: دستگاه کروماتوگرافی گازی، دستگاه کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی و اسانس گیاه

ابتدا نمونه آماده شده اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی^۱ تزریق شد و مناسب ترین برنامه ریزی دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیبات اسانس بدست آورده شد. سپس اسانس به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار^۲ جرمی نیز تزریق شده و طیف جرمی ترکیب ها را بدست آوردیم و با استفاده از شاخص بازداری، بررسی طیف های جرمی و مقایسه آن ها با طیف های مرجع شناسایی هر یک از اجزای اسانس انجام شد (Adams, 2001). در این مطالعه دستگاه GC-MS از نوع Agilent6890 با ستون موئینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS با برنامه دمایی ستون در ابتدا بصورت ۷۰ درجه سانتیگراد با توقف ۲ دقیقه در این دما سپس افزایش دما تا ۲۲۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، و افزایش دمای ستون تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه استفاده شد.



شکل ۳-۱ تصویر از دستگاه GC-MS

^۱ Gas chromatography

^۲ Gas Chromatography/ Mass Spectrophotometer

۳-۶- ارزیابی ترکیبات فنولیک

مواد و وسایل لازم: اسید گالیک، محلول فولین، آب مقطر، محلول کربنات سدیم، لوله آزمایش، پیپت و دستگاه

اسپکتروفوتومتر

سنجش مواد فنولیک تام با استفاده از واکنشگر فولین سیوکالتو (سیگما آلدریج^۱) و اسید گالیک به عنوان استاندارد انجام می شود (Dapkevicius et al, 1998). ۰/۱ میلی لیتر از اسانس مذکور را در ارلن ریخته و ۴۶ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر واکنشگر فولین سیوکالتو به آن اضافه کردیم، سپس محتویات ارلن مایر به شدت مخلوط و بعد از ۳ دقیقه، ۳ میلی لیتر از محلول کربنات سدیم ۲٪ اضافه کرده و محلول را به مدت ۲ ساعت روی صفحه تکان دهنده با شدت متوسط قرار دادیم و سپس جذب آن در ۷۶۰ nm به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. عملیات انجام شده در بالا را برای محلول های استاندارد اسید گالیک (۱۰۰۰-۰ میکرو گرم در ۰/۱ میلی لیتر) هم انجام دادیم و منحنی استاندارد آن را رسم و بر اساس آن غلظت مواد فنولیک را محاسبه و بر حسب میکرو گرم اسید گالیک بر میلی لیتر اسانس بیان کردیم.



شکل ۳-۲ تصویری از یک دستگاه اسپکتروفوتومتر

^۱ Sigma Aldrich

۳-۷- میزان فلاونوئیدها

مواد و وسایل مورد نیاز: محلول کلرید آلومینیوم، کوئرسیتین، لوله آزمایش، پیپت و دستگاه اسپکتروفوتومتر

جهت اندازه گیری محتوی فلاونوئیدی اسانس گیاه، ابتدا غلظت های مختلفی از اسانس را تهیه و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از هر غلظت را در لوله آزمایش ریختیم و به هر لوله ۵۰۰ میکرولیتر محلول کلرید آلومینیوم ۲ % حل شده در اتانول اضافه و لوله ها را به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار دادیم و سپس جذب محلول ها را در ۴۲۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری کردیم (Mikkonen et al, 2001). با استفاده از همین روش منحنی استاندارد کوئرسیتین در محدوده ۵ تا ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر کوئرسیتین رسم کردیم و مقدار کل ترکیبات فلاونوئید اسانس گیاه را برحسب میکرو گرم کوئرسیتین بر میلی لیتر اسانس گیاهی محاسبه کردیم.

۳-۸- بررسی خواص آنتی اکسیدانی اسانس با روش DPPH

مواد و وسایل مورد نیاز: محلول متانولی DPPH، بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن، ارلن و دستگاه اسپکتروفوتومتر

ارزیابی توانایی هیدروژن دهنده گی عصاره ها و اسانس ها، به واسطه بی رنگ نمودن محلول متانولی ارغوانی رنگ DPPH^۱ اندازه گیری شد (Burits and Bucar, 2000). در این ارزیابی طیف سنجی، از رادیکال پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل به عنوان عامل واکنش دهنده استفاده می شود. روش کار بدین صورت بود که ۵۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف اسانس به ۵ میلی لیتر محلول متانولی ۰/۰۰۴ درصد DPPH افزوده شد و بعد از ۳۰ دقیقه نگه داری در دمای اتاق، جذب در طول موج ۵۱۷ nm در مقایسه با شاهد قرائت شد. بازداري رادیکالی آزاد DPPH بر اساس درصد (I%) به صورت زیر محاسبه می شود:

$$I\% = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100 \quad \text{فرمول ۳-۱:}$$

^۱ 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl

که A_{blank} جذب محلول شاهد (حاوی همه مواد واکنشگر به جز اسانس) و A_{sample} جذب محلول حاوی غلظت های مختلف اسانس است. آنتی اکسیدان سنتزی BHT نیز به عنوان کنترل مثبت به کار می رود آزمایشات در ۳ تکرار انجام شد و میانگین آن ها بعنوان عدد مورد نظر اعلام شد.

۳-۹- خصوصیات ضد میکروبی و بهداشتی اسانس علیه باکتری E.coli O157:H7

مواد و وسایل مورد نیاز: شیر، محیط کشت آگوشت قلب و مغز (BHI)، محیط کشت EMB، کشت لیوفیلیزه E.coli O157:H7، استارتر، پیپت پاستور، میکروپلیت، میکرو تیوپ، سر سمپلر زرد و آبی، لوله فالكول، ظروف شیشه ای درب دار، پیپت، پلیت های کشت، بالن های شیشه ای، دستگاه شیکر، هیت و آون

ارزیابی حداقل غلظت ممانعت کننده رشد MIC^۱ تحت شرایط دمایی ثابت روی باکتری E.coli O157:H7، به روش گولوس و همکاران انجام شد (Gulluce et al, 2007). روش میکروبیولوژی، روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد با استفاده از پلات های ۹۶ خانه می باشد. تعیین MIC در این روش بر پایه مشاهده چشمی یا تشخیص کدورت با استفاده از جذب نوری توسط دستگاه Plate Reader می باشد. ابتدا کشت باکتریایی در محیط آگوشت قلب و مغز به مدت ۱۲ ساعت انجام شد و برای افزایش حلالیت و گسترش یکنواخت اسانس در محیط کشت از دی متیل سولفوکساید ۵ درصد به عنوان امولسیفایر و آگار آگار به میزان ۰/۰۵ درصد (به عنوان پایدار کننده) استفاده گردید.

بطوری که در هر چاهک ۸۰ میکرولیتر محیط کشت آگوشت BHI^۲ استریل، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های متوالی اسانس مورد مطالعه و در نهایت ۲۰ میکرولیتر کشت باکتریایی که حاوی حدود 10^5 cfu/ml از باکتری E.coli O157:H7 است اضافه شد. در ادامه میکروپلیت ها بمدت ۲۰ ثانیه با دور ۳۰۰ rpm شیک شده و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد بمدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون مقدار MIC بر حسب

^۲ Minimum inhibition concentration

^۱ Brain Heart Infusion Broth (BHI)

میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه گردید. حداقل غلظتی که ایجاد حالت عدم رشد یا عدم کدورت مشهود در مقایسه با گروه کنترل کند بعنوان MIC تعیین گردید.

جهت بررسی خاصیت ضد میکروبی در مدل غذایی دوغ، ابتدا دوغ را با روش زیر تهیه کردیم:

شیر پاستوریزه را حرارت داده تا دمایش به ۴۳ درجه سانتی گراد افزایش یافت و در این دما ۲ درصد استارتر شامل باکتری های استرپتوکوکوس ترموفیلوس، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و گونه های مختلف لاکتوباسیلوس و کمتر از ۱ درصد نمک اضافه کرده در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد تا رسیدن به $\text{pH} = 4/6$ گرم خانه گذاری شد (Simsek et al, 2007). دوغ حاصل به ۶ بچ جداگانه تقسیم و به هر یک از بچ ها تعداد 10^6 cfu/ml باکتری مورد آزمایش از قبل آماده شده اضافه گردید. سپس غلظت های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ ppm از اسانس را اضافه به مدت دو هفته در شرایط یخچالی نگه داری و طی روزهای یک، سه، پنج، هفت، ده و چهارده از لحاظ خصوصیات باکتریایی یعنی ماندگاری اشرفیا مورد ارزیابی قرار داده شد (هر کدام از تیمارها در سه تکرار انجام شد). شمارش E.coli O157:H7 در محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار و با روش کشت سطحی انجام شد (Aligiannis et al, 2001).

۳-۱۰- ارزیابی خصوصیات حسی

برای ارزیابی ویژگی های حسی ناشی از افزودن اسانس کهلیک اوتی به دوغ از آزمون پذیرش حسی^۱ استفاده گردید. برای این منظور دوغ آماده شده به شش قسمت (شامل ۵۰۰ میلی لیتر دوغ در فلاسک ها با حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر) تقسیم شد، سپس اسانس مورد مطالعه در غلظت های مورد مطالعه به هر فلاسک اضافه شد. ارزیابی حسی بوسیله یک پانل پنج نفره صورت پذیرفت. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی دوغ حاوی اسانس را با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره ای^۲ مشخص نمودند (Meilgaard et al, 1999).

^۱Sensory acceptance test

^۲Nine point hedonic scale

در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتاً خوب، نمره ۵ نه خوب نه بد، نمره ۴ نسبتاً بد، نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و نهایتاً نمره ۱ فوق العاده بد، برای ارزیابی ویژگی های حسی لحاظ گردید.

۳-۱۱- آنالیز فیزیکوشیمیایی

برای هر یک از بچ های دوغ حاوی غلظت های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ ppm اسانس نگه داری شده در دمای یخچالی، در روزهای یک، سه، پنج، هفت، ده و چهارده آزمایشات زیر را انجام می دهیم :

مواد و وسایل مورد نیاز: آب مقطر، محلول بافری، هیدروکسید سدیم ۰/۱، معرف فنول فتالئین، اسید سولفوریک ۸۴ درصد، الکل ایزوآمیلیک، پیپت، Ph متر، بورت، ارلن، بوته چینی، بوتیرومتر، بن ماری و شعله

۳-۱۱-۱-Ph: دوغ با یک Ph متر دیجیتالی مجهز به یک الکتروود استاندارد شیشه ای اندازه گیری شد. Ph متر قبل از استفاده ابتدا با محلول های بافری با Ph ۹ و ۴ کالیبره شد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۷).

۳-۱۱-۲- اسیدیته قابل تیتراسیون^۱: دوغ با مخلوط کردن ۲۵ میلی لیتر دوغ با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر و تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال انجام شد و سپس با قرار دادن مقدار سود مصرفی در فرمول زیر اسیدیته بر حسب درصد اسید لاکتیک محاسبه شد (Simsek, Sagdic and Ozcelik, 2007).

فرمول ۳-۲:

(میلی لیتر سود مصرفی $\times ۱۰۰ \times ۰/۰۰۹$) / (وزن نمونه بر حسب گرم) = اسیدیته بر حسب درصد اسید لاکتیک

¹ The titratable acidity

۳-۱۱-۳- مواد جامد کل^۱: دوغ از طریق حرارت دادن دوغ در دمای ۱۰۴ درجه سانتی گراد تا ثابت شدن

وزن آن و بعد وزن کردن آن و کم کردن از وزن اولیه دوغ اندازه گیری شد (Simsek, Sagdic and Ozcelik, 2007).

۳-۱۱-۴- چربی دوغ: با استفاده از روش ژربر^۲ با شماره استاندارد ۳۸۴ انجام شد (استاندارد ملی ایران،

۱۳۸۹). بدین صورت که ۱۱ میلی لیتر دوغ را با ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۸۴ درصد و ۱ میلی لیتر الکل ایزوآمیلیک در درون بوتیرومتر ریخته هم زدیم و در داخل بن ماری ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم و سپس از روی ستون مندرج بوتیرومتر مقدار چربی را قرائت کردیم.

¹ Total solid

² Gerber method

۳-۱۲- متغیرها

جدول ۳-۱ متغیرها

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			چگالی	پیشگی	اسیدی	بازایی		
ترکیبات اسانس	*	-	-	-	*	-	اجزای تشکیل دهنده اسانس	میلی گرم در گرم اسانس
ترکیبات فنولیک	-	*	*	-	-	-	ترکیبات با گروه OH روی حلقه آروماتیک	میلی گرم اسید گالیک در گرم اسانس
ترکیبات فلاونوئید	-	*	*	-	-	-	رنگدانه های زرد با هسته ساختمانی بنزوپیرن	میلی گرم کوئرستین بر گرم اسانس
خاصیت آنتی اکسیدانی	-	*	*	-	-	-	قدرت هیدروژن دهنده به رادیکال آزاد DPPH	میلی لیتر
گروه ماده غذایی	*	-	*	-	-	-	بج های دوغ با غلظت های مختلف اسانس	میلی گرم در میلی لیتر
اثر ضد میکروبی	-	*	*	-	-	-	کمترین مقدار اسانس که خاصیت بازدارندگی از رشد را دارد	میلی گرم در میلی لیتر
اثر ضد میکروبی	-	*	*	-	-	-	شمارش باکتریایی در روی پلیت محیط کشت	میلی گرم در میلی لیتر
خصوصیات حسی (طعم و مزه)	-	*	*	-	-	-	ارزیابی از نظر طعم و مزه	نمره ۱-۹
تعیین Ph	-	*	*	-	-	-	منفی لگاریتم غلظت یون هیدروژن	میلی لیتر در لیتر
ماد جامد کل	-	*	*	-	-	-	ترکیباتی که در سوزاندن تبدیل به خاکستر	گرم در لیتر
اسیدیته قابل تیتراسیون	-	*	*	-	-	-	اسید های چرب آزاد	گرم اسیدلاکتیک در لیتر
چربی	-	*	*	-	-	-	مقدار گلیسریدها	گرم در لیتر

فصل چهارم

یافته ها

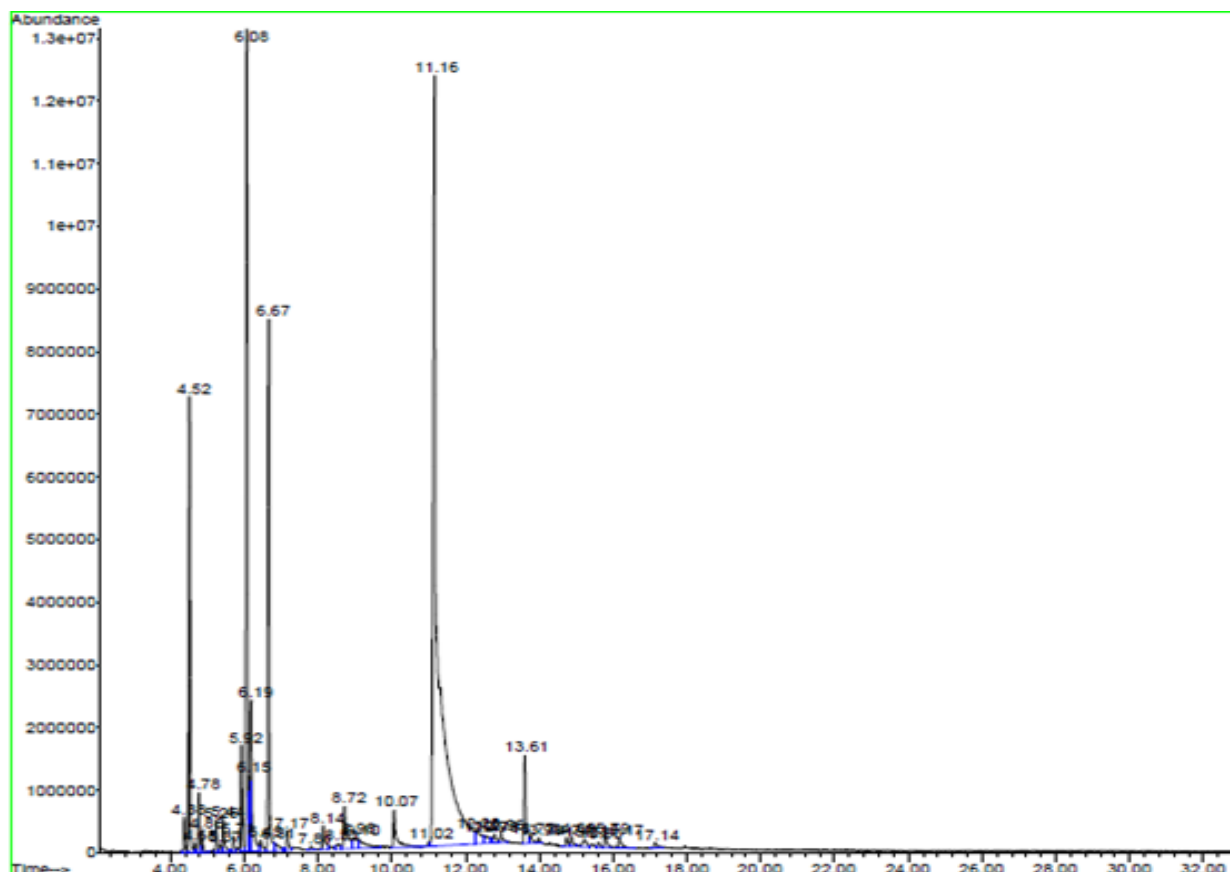
۴-۱- نتایج آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده

نتایج آنالیز دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی در مورد ترکیبات تشکیل دهنده اسانس کهلپیک اوتی و درصدشان به شرح زیر بود.

جدول ۴-۱ آنالیز ترکیبات اسانس کهلپیک اوتی با استفاده از GC/MS

شماره	ترکیبات	زمان بازداری(دقیقه)	درصد
۱	آلفا توچن	۴/۳۸	۰/۶۵
۲	آلفا پینن	۴/۵۲	۷/۴۲
۳	کامفن	۴/۷۸	۰/۹۵
۴	بتا میرسن	۵/۴۴	۰/۷۵
۵	آلفا ترپنین	۵/۹۲	۱/۸۷
۶	پارا-سیمن	۶/۰۸	۱۳/۷۸
۷	بتا فلاندرن	۶/۱۵	۱/۰۵
۸	۸و۱ سینئول	۶/۱۹	۳/۳۵
۹	گاما ترپنین	۶/۶۷	۹/۰۳
۱۰	کامفور	۸/۱۴	۰/۵۸
۱۱	سیکلو هگزان	۸/۷۲	۱/۵۸
۱۲	ایزوبورنیل پروپیونات	۹/۱۱	۰/۹۳
۱۳	کارواکرول	۱۱/۰۶	۱/۴۱
۱۴	تیمول	۱۱/۱۶	۵۱/۱
۱۵	ترانس کاریوفیلین	۱۳/۶۰	۱/۹۳
۱۶	جرماکرن D	۱۴/۸۸	۰/۳۹
۱۷	دلتا کادینن	۱۵/۷۹	۰/۳۸
۱۸	سیس آلفا بیزابولن	۱۶/۱۷	۰/۳۹
جمع			۹۷/۴۴

در بین ترکیبات موجود در اسانس کهلیک اوتی تیمول (۵۱/۵۱٪)، پارا-سیمن (۱۳/۷۸٪)، گاما ترپینن (۹/۰۳٪)، آلفا پینن (۷/۴۲٪) و ۸و۱ سینئول (۳/۳۵٪) بیشترین درصد ترکیبات را تشکیل می دهند. این ۱۸ ترکیب شناسایی شده موجود در جدول ۱-۴ در مجموع ۹۷/۴۴ درصد کل ترکیبات تشکیل دهنده اسانس را شامل می شوند. نمودار زیر کروماتوگرام اسانس کهلیک اوتی بدست آمده از دستگاه GC-MS می باشد.



نمودار ۱-۴ کروماتوگرام اسانس کهلیک اوتی

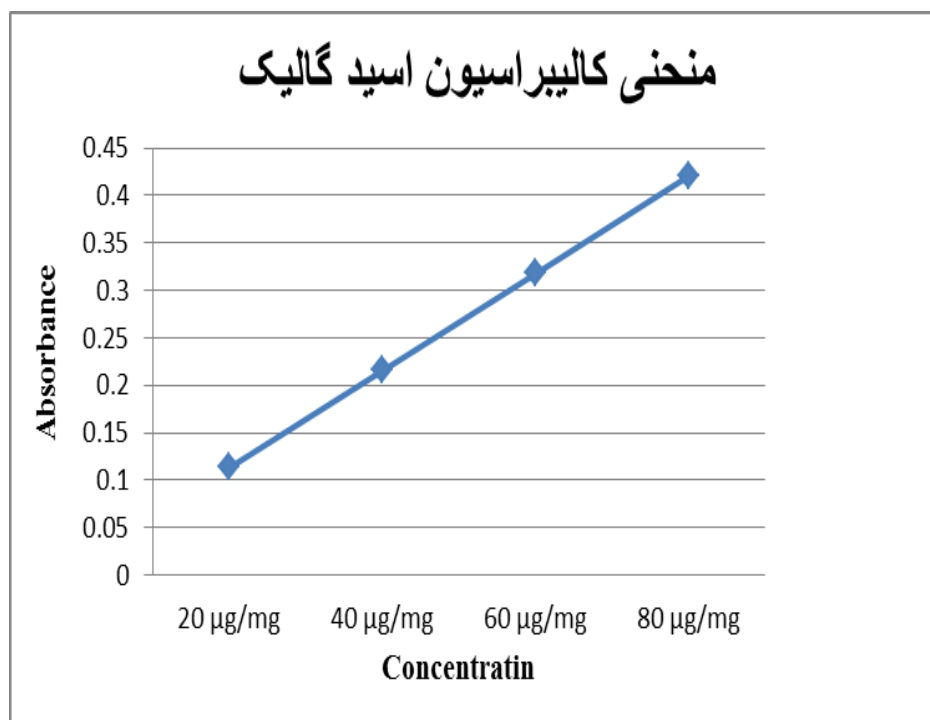
۴-۲- فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنولیک و فلاونویدی اسانس کهلیک اوتی

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس روش دی پی پی اچ نشان داد که IC_{50} (غلظتی از هر نمونه که قادر به دام انداختن و یا مهار ۵۰٪ رادیکال های آزاد) اسانس کهلیک اوتی برابر با ۳۲/۳۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود که در مقایسه با بوتیلید هیدروکسی تولوئن (BHT) ضعیف تر است. هم چنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسانس مهار رادیکال های آزاد با قدرت بیشتری صورت می گیرد.

جدول ۴-۲ IC_{50} اسانس و کنترل ها

ترکیب	$IC_{50}(\mu g/ml)$
اسانس	۳۲/۳۵
Vitamin C	۵/۱۸
BHT	۷/۰۶

محتوی ترکیبات فنلی اندازه گیری شده اسانس از روش فولین سیوکالتو $82 \pm 6/43$ میکرو گرم اسید گالیک بر میلی لیتر اسانس بود و محتوی فلاونوید اندازه گیری شده اسانس از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیم $30/79 \pm 0/5$ میکرو گرم کوئرسیتین بر میلی لیتر اسانس بود که جداول آن ها در صفحه بعد موجود می باشد.



نمودار ۲-۴ منحنی استاندارد اسید گالیک

جدول ۳-۴ مقدار ترکیبات فنولیک

	Concentration (µg/ml)	Total Phenolic/Rutin (µg/ml)*	Total Phenol%
اسانس	۴۰۰	۸۲±۶/۴۳	۲۰/۵

مقادیر به صورت Mean±SD

جدول ۴-۴ مقدار ترکیبات فلاونویدی

	Concentration (µg/ml)	Total flavonoids/Rutin (µg/ml)*	Total flavonoids%
اسانس	۴۰۰	۳۰/۷۹ ± ۰/۵	۷/۶۹

مقادیر به صورت Mean±SD

۴-۳-۱ ارزیابی خصوصیت ضد میکروبی اسانس

۴-۳-۱-۱ روش میکرودايلوشن

بر اساس نتایج بدست آمده حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد اسانس کهلیک اوتی برای باکتری E.coli O157:H7 برابر با ۴۷۰ میکروگرم در میلی لیتر می باشد.

۴-۳-۲ اثر ضد باکتریایی اسانس در مدل غذایی

آنالیز داده نشان داد که رابطه معنی داری ($p < 0.05$) بین استفاده از اسانس و هم چنین غلظت های بالاتر آن در ارتباط با از بین بردن باکتری مورد نظر در دوغ وجود دارد و با افزودن غلظت های بالاتر اسانس باکتری های موجود در دوغ سریعتر از بین رفته و در همان روزهای اولیه غیر قابل شناسایی می شوند.

جدول ۴-۵ شمارش باکتری E.coli در نمونه های دوغ با غلظت های مختلف اسانس در طی بازه زمانی ۱۴ روزه (log CFU/ml)

نمونه دوغ	دوره نگه داری (روز)					
	۱	۲	۳	۷	۱۰	۱۴
F	۳/۱۸±۰/۱۷	۳/۰۲±۰/۲۳	۱/۶۰±۰/۱۳	۱/۰۲±۰/۰۹	--	--
A	۳/۱۳±۰/۰۵	۲/۰۳±۰/۰۸	--	--	--	--
B	۲/۹۲±۰/۲۱	۱/۳±۰/۱۲	--	--	--	--
C	۱/۶۹±۰/۰۷	--	--	--	--	--
D	--	--	--	--	--	--
E	--	--	--	--	--	--

-: غیر قابل شناسایی

A: دوغ با ۵۰ ppm اسانس، B: دوغ با ۱۰۰ ppm اسانس، C: دوغ با ۲۰۰ ppm اسانس، D: دوغ با ۳۰۰ ppm اسانس، E: دوغ با ۵۰۰ ppm اسانس و F: دوغ فاقد اسانس

۴-۴-۱ ارزیابی حسی دوغ حاوی غلظت های مختلف اسانس

آنالیز داده های بدست آمده از نمره دهی داورها با نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که قابلیت پذیرش دوغ حاوی غلظت های مختلف اسانس با هم اختلاف معنی داری داشته و اسانس اضافه شده در غلظت های مختلف تغییرات معنی داری در طعم و مزه و قابلیت پذیرش دوغ ایجاد می کند. برای بررسی اینکه چه گروه هایی با هم اختلاف معنی داری دارند از تست tukey استفاده کردیم. نتایج نشان داد که دوغ دارای ۵۰ ppm اسانس در مقایسه با سایر گروه ها از نظر قابلیت پذیرش و طعم و مزه مطلوب تر بوده و گروه A در رتبه اول و گروه های F و B و C و D و در نهایت E به ترتیب در رده های بعدی قرار داشتند در نتیجه می توان گفت که

غلظت های پایین تر اسانس طعم و مزه مطلوبتری ایجاد می کنند که در زیر جدول میانگین داده ها موجود می- باشد.

جدول ۴-۶ قابلیت پذیرش دوغ حاوی غلظت های مختلف اسانس

نمونه دوغ	صفر ppm	۵۰ ppm	۱۰۰ ppm	۲۰۰ ppm	۳۰۰ ppm	۵۰۰ ppm
قابلیت پذیرش	۷/۷۵۸±۰/۱۱۳	۸/۰۱۰±۰/۰۹۰	۷/۴۸۴±۰/۱۳۹	۷/۰۵۴±۰/۱۴۱	۶/۱۳۸±۰/۱۰۸	۵/۲۱۸±۰/۱۷۶

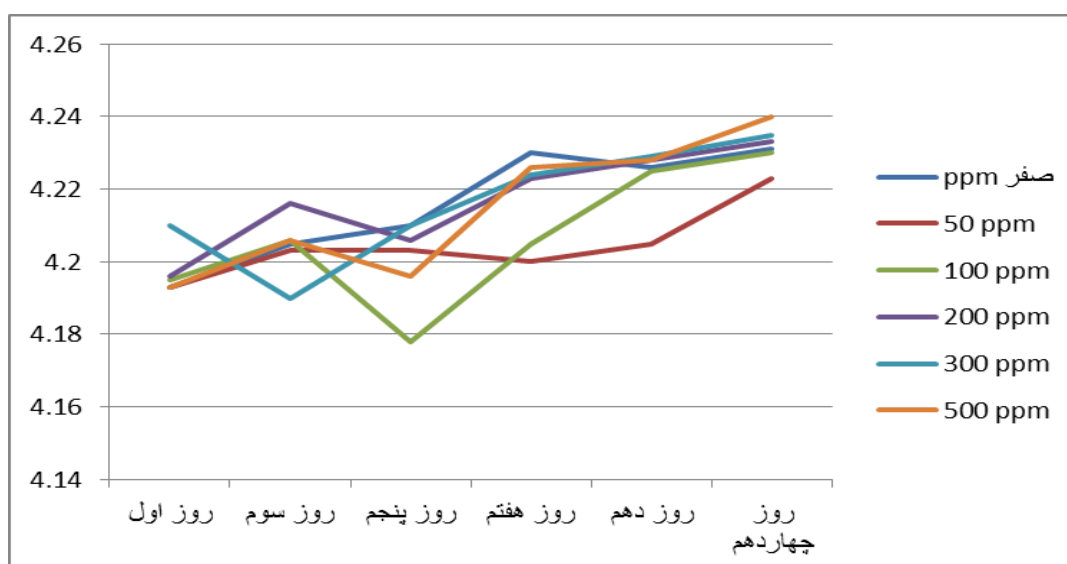
۴-۵- بررسی خواص فیزیکی شیمیایی دوغ حاوی غلظت های مختلف اسانس

پس از جمع آوری داده ها، آن ها را با استفاده از نرم افزار spss تجزیه و تحلیل کردیم و از آنالیز واریانس برای داده های تکرار و از تست تعقیبی tukey برای مقایسه دو تایی گروه های مختلف استفاده کردیم. نتایج نشان داد که در هر یک از خاصیت های فیزیکی شیمیایی در گروه های با غلظت های مختلف اسانس از ابتدای دوره تا انتهای دوره ما تغییرات معنی داری را شاهد هستیم و با گذشت زمان اختلافات بین داده ها معنی دار خواهد بود.

آنالیز داده های Ph نشان داد که با گذشت زمان این خصوصیت به طور معنی داری ($P < 0/001$) در هر گروه افزایش پیدا کرده است. نتایج آنالیز نشان داد که اختلاف معنی داری بین Ph دوغ حاوی اسانس و فاقد اسانس وجود ندارد ($p > 0.05$) به این معنی که افزایش غلظت اسانس تغییر معنی داری در Ph دوغ ایجاد نکرد.

جدول ۴-۷ میانگین داده های Ph دوغ با غلظت های مختلف اسانس در طول دوره ۱۴ روزه

روز \ نمونه دوغ	۱	۳	۵	۷	۱۰	۱۴
ppm صفر	۴/۱۹۳	۴/۲۰۵	۴/۲۱۰	۴/۲۳۰	۴/۲۲۶	۴/۲۳۱
۵۰ ppm	۴/۱۹۳	۴/۲۰۳	۴/۲۰۳	۴/۲۰۰	۴/۲۰۵	۴/۲۲۳
۱۰۰ ppm	۴/۱۹۵	۴/۲۰۶	۴/۱۷۸	۴/۲۰۵	۴/۲۲۵	۴/۲۳۰
۲۰۰ ppm	۴/۱۹۶	۴/۲۱۶	۴/۲۰۶	۴/۲۲۳	۴/۲۲۸	۴/۲۳۳
۳۰۰ ppm	۴/۲۱۰	۴/۱۹۰	۴/۲۱۰	۴/۲۲۴	۴/۲۲۹	۴/۲۳۵
۵۰۰ ppm	۴/۱۹۳	۴/۲۰۶	۴/۱۹۶	۴/۲۲۶	۴/۳۰۱	۴/۲۴۰



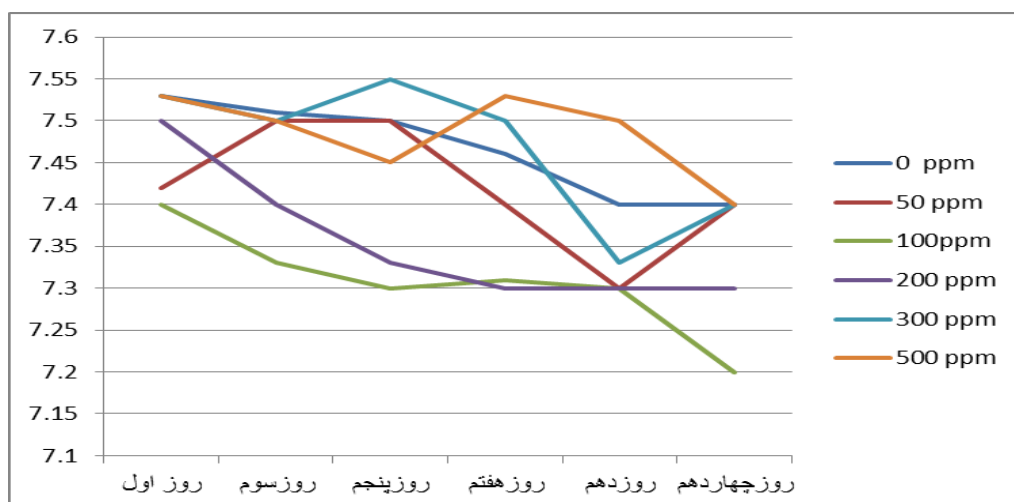
نمودار ۳-۴ تغییرات Ph دوغ در روزهای مختلف

آنالیز داده های بدست آمده از اندازه گیری مواد جامد کل نشان داد که مواد جامد کل دوغ با گذشت زمان در طی دوره نگه داری تغییر معنی داری پیدا کرده ($p < 0.001$) و با گذشت زمان مقدار آن در تمام گروه ها کاهش یافت.

ولی تست Tukey نشان داد که فقط در بین گروه فاقد اسانس با دو گروه B و C که به ترتیب دارای غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm اسانس هستند از نظر مواد جامد کل اختلاف معنی دار وجود دارد و مواد جامد کل دوغ فاقد اسانس از دو گروه دیگر بیشتر بود.

جدول ۴-۸ میانگین داده های مواد جامد کل دوغ حاوی غلظتهای مختلف اسانس در طول دوره ۱۴ روزه

روز نمونه دوغ	۱	۳	۵	۷	۱۰	۱۴
۰ ppm	۷/۵۳	۷/۵۱	۷/۵۰	۷/۴۶	۷/۴۰	۷/۴۰
۵۰ ppm	۷/۴۲	۷/۵۰	۷/۵۰	۷/۴۰	۷/۳۰	۷/۴۰
۱۰۰ ppm	۷/۴۰	۷/۳۳	۷/۳۰	۷/۳۱	۷/۳۰	۷/۲۰
۲۰۰ ppm	۷/۵۰	۷/۴۰	۷/۳۳	۷/۳۰	۷/۳۰	۷/۳۰
۳۰۰ ppm	۷/۵۳	۷/۵۰	۷/۵۵	۷/۵۰	۷/۳۳	۷/۴۰
۵۰۰ ppm	۷/۵۳	۷/۵۰	۷/۴۵	۷/۵۵	۷/۵۰	۷/۴۰

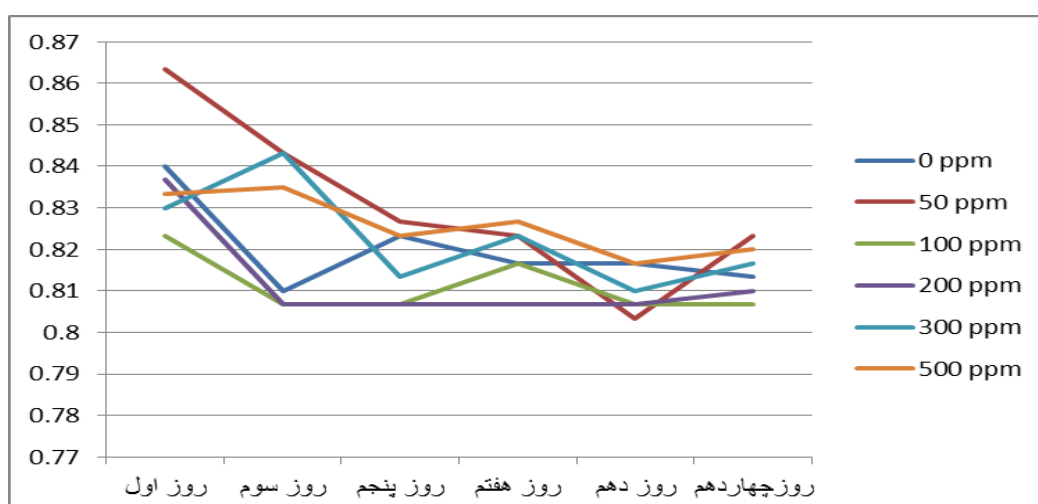


نمودار ۴-۴ تغییرات مواد جامد کل دوغ در روزهای مختلف

آنالیز داده های بدست آمده از روش ژریر برای چربی دوغ نشان داد که با گذشت زمان تغییرات چربی در گروه ها معنی دار ($p < 0.001$) است و با گذشت زمان در تمام گروه های مورد مطالعه مقدار چربی کاهش یافت ولی تغییر غلظت های مختلف اسانس اضافه شده به دوغ تاثیر معنی داری بر تغییرات چربی دوغ در طول دوره نگه داری ندارد ($p > 0.05$).

جدول ۴-۹ میانگین داده های چربی در دوغ با غلظت های مختلف اسانس در طول دوره ۱۴ روزه

روز \ نمونه دوغ	۱	۳	۵	۷	۱۰	۱۴
۰ ppm	۰/۸۴۰	۰/۸۱۰	۰/۸۲۳	۰/۸۱۶	۰/۸۱۶	۰/۸۱۳
۵۰ ppm	۰/۸۶۳	۰/۸۴۳	۰/۸۲۶	۰/۸۲۳	۰/۸۰۳	۰/۸۲۳
۱۰۰ ppm	۰/۸۲۳	۰/۸۰۶	۰/۸۰۶	۰/۸۱۶	۰/۸۰۶	۰/۸۰۶
۲۰۰ ppm	۰/۸۳۶	۰/۸۲۳	۰/۸۱۲	۰/۸۰۶	۰/۸۰۶	۰/۸۱۰
۳۰۰ ppm	۰/۸۳۰	۰/۸۴۳	۰/۸۱۳	۰/۸۲۳	۰/۸۱۰	۰/۸۱۰
۵۰۰ ppm	۰/۸۳۳	۰/۸۳۵	۰/۸۲۳	۰/۸۲۶	۰/۸۱۶	۰/۸۲۰

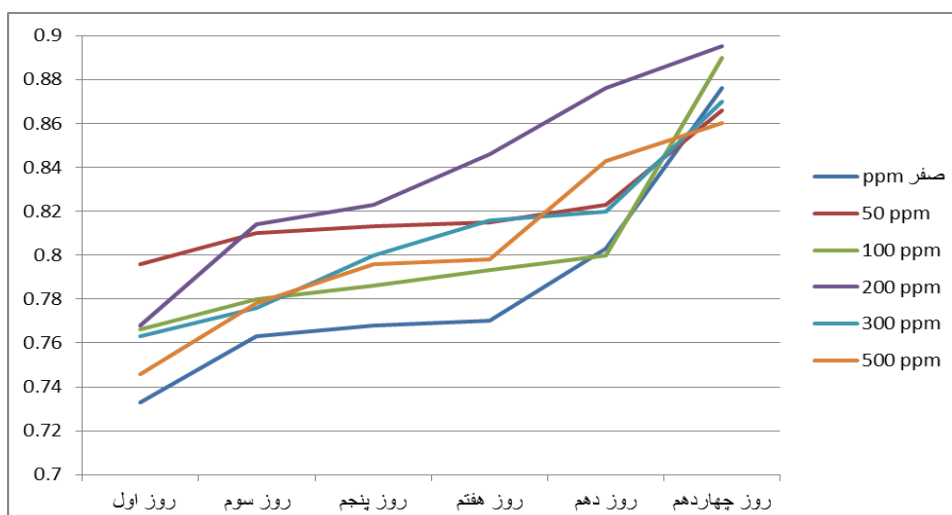


نمودار ۴-۵ تغییرات چربی دوغ در روزهای مختلف

آنالیز داده های بدست آمده برای اسیدپتیه قابل تیتراسیون نشان داد که باز با گذشت زمان در طول دوره نگه داری تغییرات معنی داری ($p < 0.001$) در اسیدپتیه مشاهده شده و اسیدپتیه در تمام گروه ها افزایش یافته است. هم چنین غلظت های مختلف اسانس تغییرات معنی داری ($p < 0.05$) در اسیدپتیه قابل تیتراسیون ایجاد می کنند و آنالیز صورت گرفته به وسیله تست tukey نشان داد که این اختلاف معنی دار در بین گروه F با گروه C وجود دارد و اسیدپتیه دوغ با ۲۰۰ ppm اسانس بیشتر بود.

جدول ۴-۱۰ میانگین داده های اسیدپتیه در دوغ با غلظت های مختلف اسانس در طول دوره ۱۴ روزه

روز / نمونه دوغ	۱	۳	۵	۷	۱۰	۱۴
۰ ppm	۰/۷۳۳	۰/۷۶۳	۰/۷۶۸	۰/۷۷۰	۰/۸۰۳	۰/۸۷۶
۵۰ ppm	۰/۷۹۶	۰/۸۱۰	۰/۸۱۳	۰/۸۱۵	۰/۸۲۳	۰/۸۶۶
۱۰۰ ppm	۰/۷۶۶	۰/۷۸۰	۰/۷۸۶	۰/۷۹۳	۰/۸۰۰	۰/۸۹۰
۲۰۰ ppm	۰/۷۶۸	۰/۸۱۴	۰/۸۲۳	۰/۸۴۶	۰/۸۷۶	۰/۸۹۵
۳۰۰ ppm	۰/۷۶۳	۰/۷۷۶	۰/۸۰۰	۰/۸۱۶	۰/۸۲۰	۰/۸۷۰
۵۰۰ ppm	۰/۷۴۶	۰/۷۷۸	۰/۷۹۶	۰/۷۹۸	۰/۸۴۳	۰/۸۶۰



نمودار ۴-۶ تغییرات اسیدپتیه دوغ در روزهای مختلف

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

بحث

با توجه به بررسی های صورت گرفته در این تحقیق و نتایج حاصل از آن که نشان می دهد اسانس کهلپیک اوتی از نظر ترکیبات شیمیایی از جمله ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی از پتانسیل بالایی برخوردار و دارای ترکیبات فنولیک و قدرت آنتی اکسیدانی مطلوبی می باشد. هم چنین با توجه به حداقل غلظت ممانعت کنندگی و نتایج کشت ماده غذایی دوغ اسانس دار که بیانگر قدرت ضد میکروبی مطلوب این اسانس گیاهی است و نتایج ارزیابی حسی دوغ دارای غلظت های مختلف اسانس و تعیین فاکتورهای فیزیکی شیمیایی در این قسمت به مقایسه این نتایج با سایر مطالعات مشابه دیگر می پردازیم.

امروزه افزودن مواد شیمیایی به منظور نگه داری مواد غذایی معمولاً بر مبنای جلوگیری از رشد میکروبی و یا کشتن و از بین بردن گروهی از میکروارگانیسم های مضر و هم چنین به تاخیر انداختن اکسیداسیون می باشد. با توجه به نگرانی های عمومی در خصوص عوارض نگه دارنده های شیمیایی تمایل به مصرف محصولات طبیعی است که فاقد نگه دارنده بوده و یا در آن ها از نگه دارنده های طبیعی استفاده شده است. به همین دلیل در سال های اخیر مطالعات زیادی پیرامون نگه دارنده های طبیعی صورت گرفته است. از جمله این نگه دارنده ها اسانس ها و عصاره های گیاهی است. اسانس ها و عصاره های گیاهان و اجزای تشکیل دهنده آن ها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی می باشند در این زمینه مطالعات زیادی صورت گرفته است (Canillac and Mourey, 2001).

اسانس ها و عصاره های حاصل از گیاهان هزاران سال است که به صورت طعم دهنده و دارو در همه دنیا مورد استفاده قرار می گیرند. گزارش های متعددی مبنی بر خواص ضد میکروبی اسانس و عصاره برخی گیاهان دارویی وجود دارد بنابراین از آنجایی که گیاهان می توانند نقش موثری در کنترل بیماری های میکروبی داشته باشند ارزیابی دقیق گیاهان دارویی امری ضروری است از این رو در این مطالعه به ارزیابی خواص مختلف گیاه کهلپیک اوتی در مدل غذایی دوغ پرداختیم (قاسمی پیربلوتی، ۱۳۸۹).

باگسی و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه ای که بر روی دو گونه آویشن در ترکیه انجام دادند ترکیبات تشکیل دهنده T. Kotschyanus در مرحله گل دهی را به صورت کارواکرول (۱۱/۷٪)، تیمول (۳۵/۵٪)، پارا- سیمن (۱۷/۷٪)،

آلفا پینن (۸/۸٪) و آلفا-تریپنئول (۶/۵٪) گزارش نمودند که از نظر ترکیبات مشابه مطالعه ما ولی از نظر درصد ترکیبات تشکیل دهنده تا حدودی اختلاف وجود دارد (Bagci and Baser, 2005).

رسولی و میرمصطفی (۲۰۰۳) در تجزیه شیمیایی اسانس دو گونه آویشن T. Persicus و T. Kotschyanus مقادیر متوسط و بینایی از کارواکرول و تیمول را یافته اند به طوری که درصد کارواکرول به ترتیب ۲۲/۷ و ۲۷ درصد بوده و تیمول آن ها به ترتیب ۱۶/۵ و ۲۷/۰۷ درصد بوده است که مجموع کارواکرول و تیمول کهلیک اوتی در این مطالعه کمتر از مجموع این دو ترکیب اصلی در مطالعه ما می باشد (Rassoli and Mirmostafa, 2003). در سال ۲۰۰۲ مطالعات N. singh و R.K Singh نشان داد که اسانس گیاه آویشن بر روی انترو هموراژیک اشریشیا کلی اثر بازدارندگی دارد. از بین ترکیبات اسانس بکار رفته تیمول و کارواکرول به عنوان عوامل مؤثر نام برده شده است و این عوامل بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی اثر دارند در تحقیق ما نیز اثر اسانس حاوی مواد مؤثره کهلیک اوتی که یک گونه از آویشن است بر روی E.coli O157:H7 به اثبات رسید (Singh et al, 2002).

عیسی صادقیان و همکاران (۲۰۱۱) اثر آنتی باکتریال میوه های بلوط واریته برانته را مورد بررسی قرار دادند. در ای مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره الکلی بر روی اشریشیا کلی قابل توجه بود و بر روی هلیکوباکتر پیلوری اثر قابل توجهی نداشت. عصاره های آبی و الکلی دارای اثر ضد باکتریایی قابل توجهی بر روی استرپتوکوک پیوژن می باشد و مقایسه فعالیت این باکتری با بعضی از آنتی بیوتیک های استاندارد نشان داد که در بعضی از موارد حتی اثر ضد باکتریایی عصاره بیشتر از آنتی بیوتیک ها بود (Sadeghian et al, 2012).

مطالعه ی بنیادیان و کریم (۲۰۰۳) روی تأثیر روغن های فرار برخی گیاهان (پونه، نعنای، ترخان، زیره و آویشن) بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلای در محیط کشت مایع، نشان داد که بیشترین اثر را روغن فرار آویشن بر روی این دو باکتری داراست به طوری که حداقل غلظت مهارکننده عصاره این گیاه برای باکتری های مذکور به ترتیب ۰/۱ و ۰/۰۵ درصد بود که باز قدرت ضد میکروبی اسانس ما قویتر می باشد (Bonyadian and Karim, 2003).

محمودی و همکاران (۱۳۹۱) ترکیبات تشکیل دهنده و خاصیت ضد باکتریایی اسانس زیره سبز را با دو روش تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری را تحت شرایط دمایی و Ph های مختلف مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد که حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد در محدوده ۳۷/۵-۹۶۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشنده باکتری در محدوده ۱۵۰-۹۶۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر می باشد و استافیلوکوکوس اورئوس حساسترین و اشریشیاکلی مقاومترین باکتری نسبت به اسانس بودند (محمودی، ۱۳۹۱).

در مطالعه ای که توسط رضوی و همکاران (۲۰۰۶) در مورد اثرات اسانس آویشن، اسید استیک، درجه حرارت و زمان نگه داری بر روی احتمال رشد یک سلول و سلول های مورد نیاز سالمونلا تیفی موریوم در محیط آبگوشت قلب- مغز صورت گرفت نشان داده شد که اسانس آویشن احتمالاً می تواند به عنوان یک نگه دارنده و ضد باکتری مناسب لاکتال علیه برخی از باکتری های گرم منفی از جمله باکتری های مورد مطالعه در برخی از مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد (Razavilar et al, 2006).

محبوبی و فیض آبادی (۱۳۸۸) اثر ضد میکروبی اسانس های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس بر باکتری های اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم و قارچ های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس را مورد ارزیابی قرار دادند. آن ها نشان دادند که اسانس های آویشن، مرزنجوش و مرزه از اسانس اکالیپتوس اثر ضد میکروبی بیشتری دارد. استفاده از اتانول به عنوان پایه حلال در مقایسه با دی متیل سولفوکساید اثر ضد میکروبی اسانس را افزایش می دهد. نوع حلال، تفاوت معنی داری در اثر بخشی اسانس ایجاد می نماید و در روش انتشار در آگار، قارچها در مقایسه با باکتری ها و آسپرژیلوس نایجر از آسپرژیلوس فلاووس نسبت به اسانس های گیاهی حساس تر بودند. حساسیت باکتری ها نسبت به اسانس ها به نوع باکتری و نوع اسانس بستگی دارد. اسانس ها بر قارچ ها اثر مهاری دارند و اثر قارچ کشی اسانس های گیاهی از اثر باکتری کشی آن ها ضعیف تر است (محبوبی و فیض آبادی، ۱۳۸۸).

Tyagi و همکاران (۲۰۱۱) پتانسیل ضد میکروبی و ترکیب اسانس اکالیپتوس^۱ را در فاز مایع و بخار در برابر میکروارگانیسم های مولد فساد غذایی را با استفاده از روش انتشار دیسک و حداقل غلظت بازدارنده (MIC) مورد بررسی قرار دادند. نتایج بدست آمده بیانگر این است که حداقل غلظت بازدارندگی برای سوبه های باکتریایی بین

^۱ Eucalyptus globulus

۲/۲۵ تا ۹ میلی گرم بر میلی لیتر و برای سویه های قارچی بین ۱/۱۳ تا ۲/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر متغیر است. از بین باکتری های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس ارئوس با MIC برابر ۲/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر از بین باکتری های گرم منفی سودوموناس آئروژنوزا از مقاومت بالاتری نسبت به بقیه برخوردار بود (Tyagi and Malik, 2011).

گلوس^۱ و همکاران (۲۰۰۷) مطالعه ای به منظور فعالیت ضد باکتری و آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره های متانولی پونه با استفاده از روش انتشار دیسک و حداقل غلظت بازدارندگی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه نتایج کلی بیانگر آن است که در اسانس و عصاره متانولی در برابر همه میکروارگانیسم های مورد آزمایش اثر آنتی باکتریال قوی نشان داده اند و داده های بدست آمده از روش انتشار دیسک نشان داد که قطر هاله های ایجاد شده برای باکتری ها از ۸ تا ۲۲ میلی متر بوده است. نتایج بدست آمده از MIC بیانگر آن بود که مقادیر آن برای باکتری ها از ۱۵/۶۲ تا ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بوده و باکتری های گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس و باسیلوس ماسرانس از حساس ترین باکتری ها بودند و مقاوم ترین میکروارگانیسم پروتئوس ولگاریس با مقدار MIC برابر با ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود (Gulluce et al, 2007).

در مطالعه ای که توسط خانزادی و همکاران (۲۰۰۷) در مورد اثرات اسانس آویشن، اسید استیک، درجه حرارت و زمان نگه داری بر روی احتمال رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A در محیط آبگوشت قلب- مغز صورت گرفت نتایج نشان داد که لگاریتم درصد احتمال رشد باکتری و حداقل تعداد باکتری مورد نیاز جهت شروع رشد به طور معنی داری ($p < 0.05$) تحت تأثیر غلظت های مختلف اسانس، دمای نگه داری و PH قرار دارد و بر طبق نتایج به دست آمده لگاریتم درصد احتمال رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A با افزایش غلظت اسانس، کاهش PH و کاهش دمای نگه داری، کاهش پیدا می کند (Khanzadi et al, 2007).

بطور کلی مطالعات بسیار کمی اثر اسانس کهلیک اوتی را بر روی باکتری E.coli O157:H7 در مدل غذایی و حتی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده اند. طی مطالعه ای که اثر ضد باکتریایی اسانس نعنای را بر روی باکتری های اشرشیا O157:H7 و استافیلوکوکوس اورئوس CECT 4459 در شرایط آزمایشگاهی و گوشت مورد

^۱ Gulluce

بررسی قرار دادند، مشخص گردید که غلظت مهارکنندگی اسانس نعنای برای باکتری اشرشیا کلای ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوده و در گوشت نیز باعث کاهش رشد باکتری می شود که نتایج این مطالعات نشان از اثر ضد باکتریایی قویتر اسانس ما بر علیه این باکتری در مقایسه با اسانس نعنا دارد (Deegan et al, 2006).

مطالعات متعددی افزایش خواص ضد میکروبی مواد نگه دارنده طبیعی مختلف را بصورت توأم در شرایط آزمایشگاهی و مدل های غذایی گزارش نموده اند علت افزایش تاثیر مواد ضد میکروبی به هنگام استفاده همزمان، افزایش تعداد منافذ تشکیل شده در غشای سلولی عوامل بیماریزا و متعاقباً نشت ترکیبات داخل سلولی به خارج از سلول و هم چنین مهار پروتئین های آنزیمی موجود در غشا می باشد که این پروتئین ها در حفظ ویژگی های عملکردی و ذخیره هیدروکربن ها در غشای سلولی نقش اساسی بر عهده دارند (Lv et al, 2011).

رادیکال های آزاد دارای نقش مهمی در پیدایش و تداوم حیات می باشند. به عنوان مثال رادیکال های اکسیژن دار در زمینه انتقال سیگنال ها، بیان ژن و تنظیم فعالیت گوانیلات سیکلاز در سلول ها نقش اساسی دارند. البته رادیکال های آزاد و سایر گونه های وابسته باعث اکسیداسیون بیوملکول هایی نظیر پروتئین ها، اسید های آمینه، لیپید ها و اسید های نوکلئیک می شوند که این مسئله باعث وارد آمدن صدمه به سلول و مرگ آن می شود. گونه های فعال اکسیژن به صورت کاملاً مشخصی خواص فیزیکی- شیمیایی و ایمونولوژیک سوپراکسید دیسموتاز را تحت تاثیر قرار داده و باعث افزایش صدمات اکسیداتیو در سلول ها می شوند (Bektas et al, 2005).

از جمله مهم ترین فرآورده های اکسیداسیون خودبخودی لیپیدها، هیدروپراکسید ها می باشند که خودشان فاقد طعم و بو هستند ولی فرآورده های حاصل از تجزیه آن ها نظیر آلدئید ها و کتون ها می توانند تاثیر زیادی روی طعم و بوی ماده غذایی داشته باشند. به منظور تاخیر انداختن و یا مهار اکسیداسیون از آنتی اکسیدان ها استفاده میگردد. با اضافه کردن آن ها کیفیت ماده غذایی حفظ شده و طول عمر نگه داری آن نیز افزایش پیدا می نماید. آنتی اکسیدان ها دارای منشأ طبیعی و یا ساختگی هستند. استفاده از آنتی اکسیدان های صنعتی در بعضی از کشور ها دارای محدودیت می باشد که دلیل آن اثرات نامطلوب آن ها روی سلامتی افراد می باشد. از جمله فواید آنتی-اکسیدان های طبیعی و استفاده از آن ها بجای آنتی اکسیدان های مصنوعی می توان به اثرات مفید آن ها روی

سلامتی افراد اشاره نمود. امروزه آنتی اکسیدان های طبیعی که از گیاهان و ادویه جات بدست می آید به منظور خواص آنتی اکسیدانی شان به طور گسترده ای مورد ارزیابی قرار می گیرند (Senji and yuue, 2008).

طیف سنجی فولین سیوکالتو براساس احیا شیمیایی مخلوطی از تنگستن و اکسید مولیبدن به عنوان معرف انجام می شود که در این روش ترکیبات فنولیک با اسیدهای فسفوتنگستیک و فسفو مولیبدیک موجود در فولین سیو کالتو واکنش های پیچیده انجام می دهند. مطالعات نشان می دهد که با افزایش مقدار اسانس ها مقدار ترکیبات فنولیک افزایش یافته و مقدار جذب طیف نوری مورد نظر افزایش میابد که نتایج مطالعه ما با این امر هم خوانی دارد (Curcio et al, 2009).

در مطالعه مهدی زاده و همکاران (۲۰۱۲) که ویژگیهای ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی و نوری فیلم خوراکی کامپوزیت نشاسته-کیتوزان حاوی اسانس T. Kotschyanus را ارزیابی کرده بودند نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسانس مورد نظر غلظت ترکیبات فنولیک فیلم حاوی آن بطور معنی داری ($p < 0.05$) افزایش یافته بطوری که در غلظت ۱ و ۲ درصد اسانس مقدار ترکیبات فنولیک به ترتیب ۱۰ و ۱۳/۳ میلی گرم اسید گالیک در گرم فیلم می باشد. هم چنین در این مطالعه بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی فیلم حاوی اسانس نشان داد که با افزایش غلظت اسانس خاصیت آنتی اکسیدانی بطور معنی دار افزایش میابد که هر دو نتیجه با نتایج مطالعه ما هم خوانی دارد (Mehdizade et al, 2012).

IC50 فاکتوری برای تعیین و بیان فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره های گیاهی است و به طور معکوس با فعالیت آنتی رادیکالی اسانس ها و عصاره ها در ارتباط است، هر چه این فاکتور کمتر باشد فعالیت آنتی رادیکالی بیشتر می باشد. در مطالعه Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۶، فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس جعفری با روش DPPH اندازه گیری شد که مقدار IC50 این اسانس بسیار بالا و برابر با ۲۱/۸ mg/ml بود که نشان از فعالیت آنتی اکسیدانی خیلی ضعیف این اسانس گیاهی در مقایسه با اسانس ما دارد (Zhang et al, 2006).

قادری قهفرخی و همکاران (۱۳۸۹) عصاره فنولی استخراج شده از میوه بلوط یک وارسته بلوط ایرانی را در سه غلظت در روغن آفتاب گردان با آنتی اکسیدان های سنتزی BHA و BHT مورد مقایسه قرار دادند. نتایج نشان داد

که غلظت های ۱۰۰۰ ppm و ۵۰۰ عصاره بهتر از BHT در غلظت ۲۰۰ ppm و هم چنین غلظت ۲۵۰ ppm عصاره بهتر از BHA با غلظت ۱۰۰ ppm عمل می کند (قادری قهفرخی، ۱۳۸۹).

مطالعه گولوس و همکاران در سال (۲۰۰۷) روی خواص آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی *M. longifoli* که به روش DPPH انجام گرفت نشان داد که غلظت مهار ی ۵۰ درصد (IC_{50}) برای عصاره متانولی ۷۴/۴ میکروگرم در میلی لیتر و برای اسانس گیاه مذکور ۱۰۷۰۰ میکروگرم در میلی لیتر است در مقایسه داده های این مطالعات با نتایج مطالعه ما نشان میدهد که اسانس گیاهی کهلیک اوتی مورد مطالعه ما اثر آنتی اکسیدانی قویتری دارد (Gulluce et al, 2007).

بنظر می رسد که با توجه به نتایج تحقیقات صورت گرفته ترکیبات فنلی که به صورت گسترده در گیاهان یافت میشوند و قدرت آنتی اکسیدانی بالایی دارند بیشتر از طریق عصاره های گیاهی در مقایسه با اسانس آن ها قابل استخراج می باشند. لازم به ذکر است که ترکیبات فنلی به صورت موثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده لذا به عنوان یک آنتی اکسیدان موثر عمل می کنند. در مطالعه جمشیدی و همکاران (۲۰۱۰) عصاره ی متانولی چند گیاه بومی مازندران را از نظر میزان فلاونوئید و فنلی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه آن ها نشان دادند که ارتباط مناسبی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات پلی فنلی گیاه وجود دارد (Jamshidi et al, 2010 and Muret et al, 2007).

اختلاف مشاهده شده در خواص آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی در مطالعات مختلف می تواند به علت اختلاف ترکیبات تشکیل دهنده گیاهان مذکور (تحت تاثیر ژنتیک، آب، هوا، فصل برداشت و ...) بویژه در مقدار ترکیبات فنولی و پلی فنلی آن ها باشد به گونه ای که ارتباط مستقیم بین میزان فنل و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی وجود دارد (Muret et al, 2007).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه بطور کلی نشان دهنده اثر مهاری مطلوب چه در زمینه خواص باکتریایی و چه در زمینه خواص آنتی اکسیدانی و هم چنین ارتقا ویژگی حسی ماده غذایی دوغ می باشد و به همین دلیل امکان استفاده از این اسانس در صنایع غذایی وجود دارد تا نیاز مصرف کننده برای استفاده از نگه دارنده های طبیعی در مواد غذایی و ارتقای سطح سلامت غذا تأمین شود. با این حال جهت استفاده عملی از این مواد، بررسی اثرات بازدارندگی آن ها در مدل های غذایی امری ضروری محسوب می شود و هم چنین بایستی سمیت سلولی آن در مدل های غذایی مناسب مورد بررسی قرار گیرد.

پیشنهادهات:

- ✓ مطالعه اثربخشی اسانس کهلیک اوتی در مدل غذایی در طول نگه داری مواد غذایی مختلف.
- ✓ مطالعه اثر ترکیبی اسانس کهلیک اوتی با اسانس دیگر بر روی میکروارگانیسم ها.
- ✓ بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس کهلیک اوتی روی سایر باکتری های پاتوژن مواد غذایی.
- ✓ انجام مطالعات در مدل های غذایی جهت حصول ترکیب مناسب که دارای خواص ارگانولپتیک قابل قبول می باشد.
- ✓ سمیت سلولی این مواد در مدل های مناسب مورد بررسی گردد.

منابع

- Adams RP. Identification of essential oil Components by gas chromatograPhy/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, IL. 2001.
- Aydin S, Öztürk, Y, Beis R and Baser K.H.C. 1996. Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity. *Phytother Res*; 10 :342-4.
- Bagci E and Baser K. 2005. Study of the essential oils of *Thymus haussknechtii* Velen. and *Thymus kotschyanus* Boiss. et Hohen var. *kotschyanus* (Lamiaceae) taxa from the eastern Anatolilian region in Turkey. *Journal Science Food and Agriculture*; 20(2):199-202.
- Bayoumi S. 1992. Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of yogurt. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*; 14: 21– 26.
- Bektas T, Dimitra D, Atalay S, Munevver S and Moschos P. 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extract of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* 90, 333-340.
- Bhurinder S, Bernadette fallahi M and Martin R, Adams. 2001. synergistic hnhhibition of *listeria monocytogenes* by nisin and garlic exteract . *Food Microbiology*; 18: 133-139.
- Bonyadian M, Karim G. 2003. Study of effects of some plant extracts on *E.coli* and *S.aureus* in broth medium. *Journal of veterinary faculty of Tehran*. 57(4): 81-83.
- Brunelle S. 2000. Electro immunoassay technology for food borne pathogen detection. *IVD Technol*; 16: 13 – 34

- Burits M, Bucar F. 2000 Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res.* Aug; 14(5):323-8.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology* ;94 :223– 253.
- Canillac N, Mourey A. 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excels* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol*; 18(3): 261 – 8
- Carson C.F, Mee B.J and Riley T.V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 46 (6): 1914–1920.
- ”Chemical Constituents of Essential oils” from the webpage of
<http://healingdeva.com/selena2.htm>
<http://healingdeva.com/selena3.htm>
- Curcio M, Puoci F, Iemma F, et al. 2009. Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure. *J Agric Chem Food*; 57: 5933-5938.
- Dapkevicius A VR, Van Beek TA and Linssen PH. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *journal Science Food and Agriculture*; 77:140-6.
- Daniels NA, Mackinnon L, Rowe SM, Bean NH, Griffin PM and Mead PS. 2002. ‘Foodborne disease outbreaks in United States schools, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 21. 623–628.

- Deegan L.H, Cotter PD, Hill C and Ross P. 2006. biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*; 9:1058-71.
- Demirci F, Guven K, Demirci B, Dadandi M.Y and Baser, K. H. C. 2008. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control*, 19, 1159–1164.
- Dorman H.J.D and Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*; 88: 308– 316.
- “Essential _ Oils _ Introduction” from the webpage of :
<http://www.theherbsplace.com/index.html>.
- Ghasemi Pirbalouti A, Ghasemi M, Momtaz H, Golparvar A, Hamed B and Shahgholian L. 2010. The effect of some of the Iranian medicinal plants on *Brucella abortus* on in-vitro and in-vivo. *Journal of Herbal Drugs*; 1(1):21-8.
- Ghaderi Ghahfarokhi M, Sadeghi Mahoonak A, Alami M and Azizi M. 2010. Study on Antioxidant Activities of PHenolic Extracts from Fruit of a Variety of Iranian Acorn (*Q. castaneifolia* var *castaneifolia*). *Quarterly Food Science and Technology*; 9: 526-532.(in Persian)
- Gill A.O, Delaquis P, Russo P and Holley R.A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*; 73, 83– 92.
- Golluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A and Ozken H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L.ssp.*longifolia*. *Food Chemistry* 103, 1449-1456.

- Harpaz S, Glatman L, Drabkin V and Gelman A. 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection* 66 (3), 410–417.
- Hetzel M, Bonfoh B, Farah Z, Traore M, Simbe CF, Alfaroukh IO, et al. Diarrhoea, vomiting and the role of milk consumption: perceived and identified risk in Bamako (Mali). *Tropical Medicine and International Health*. 2004. 9 (10): 1132–1138.
- Iranian National Standards Organization. 2010. Measuring fat dairy products . The Standard 384: (<http://www.isiri.org/portal/files/std/384.PDF>. 1389). (in Persian).
- Iranian National Standards Organization. 1385. Measuring Ph and acidity of milk and products. Standard No. 2852. (in Persian)
- Jemzad Z. 2009. *Avishan and marzehaye iran*. 1st ed. Tehran. Publishing research institute of forests and rangelands of iran; 415. (in Persian)
- Kamkar A, Shariatifar N and Jamshidi AM. 2010. Study of Antioxidant Functional of the Water, Methanol, and Ethanol Extracts of Endemic *Cuminum cyminum* L. and *Cardaria draba* L. in the In-vitro Systems; 16(2): 37-45.
- Karatzas A.K, Bennik M.H.J, Smid E.J and Kets E.P.W. 2000. Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*; 89: 296– 301.
- Khanzadi S, Razavilar V, Akhoundzadeh Basti A and Jamshidi E. 2007. Effect of *zataria multiflora* boiss essential oil, acetic acid, temperature and storage time on probability of growth initiation of *clostridium botulinum* type A in brain heart infusion broth. *Iranian food science and technology research journal*; 41:899-902.

- Lemay M.J, Choquette J, Delaquis P.J, Gariepy C, Rodrigue N and Saucier L. 2002. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*; 78, 217– 226.
- Loir Y.L, Baron F and Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning, genetics and molecular research; 2 (1): 63-67.
- Lv F, Liang H, Yuan Q and Li C. 2011. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 9: 3057–3064.
- Mahboubi M and Feyz Abadi. 2009. Effect of antimicrobial essential oils of thyme, marjoram, savory and eucalyptus on the bacteria *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*. *Journal of Medicinal Plants*; 8(2): 30. (in Persian)
- Mahmoudi R, Ehsani A and Zare P. 2012. Phytochemical, antibacterial and antioxidant properties of *Cuminum Cyminum* L. essential oil. *Food industry research publication* ; 22(3):312-321.(in Persian).
- Maleki S, Motamedi H, Seyyednejad S.M and Safary A. 2009. A Preliminary Study on the Antibacterial Activity of *Quercus brantii* Against Bacterial Pathogens, Particularly Enteric Pathogens. *International of Journal Botany*; 5176-180.
- “Making Essential Oils- Methods of Essential Oil Extraction” from the Webpage of <http://www.anandaapothecary.com/essential-oils.html>.
- Mead P.S. 1999. Food - Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*; 5(5) : 607-25.
- “Methods of Extraction Essential Oil” from the webpage of: <http://www.aromathyme.com/essentialoils.html>

- Mehdizadeh T, Tajik H, Razavi Rohani S.M and Oromiehie A.R. Antibacterial, 2012. antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing *Thymus kotschyanus* essential oil. Veterinary Research Forum.;3(3):167-73.
- Meilgaard M.C, Civille G.V and Carr B.T. 1999. Sensory Evaluation Techniques. Florida: Boca Raton; 123-133.
- Mejlholm O and Dalgaard P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium Phosphoreum* in liquid media and fish products. Letters in Applied Microbiology; 34, 27– 31.
- Mikkonen TP, Maatta KR, Hukkanen AT, Kokko HI, Torronen AR, Karenlampi SO, et al. 2001. Flavonol content varies among black currant cultivars. J Agric Food Chem. Jul; 49(7):3274-7.
- Moleyar V and Narasimham P. 1992. Antibacterial activity of essential oil components. International Journal of Food Microbiology; 16: 337– 342.
- Mortazavi A and Sadeghi mahunak A. 2002. Translated FOOD Microbiology, 2nd ed. Mashhad: Ferdawsi university press.282-294(in Persian)
- Mozafarian, V. 1996. Dictionary of Iranian plant names. Tehran, Farhang Moasser (in Persian).
- Nychas G.J.E. 1995. Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W. (Ed.), New Methods of Food Preservation. Blackie Academic and Professional, London; 58– 89.
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L and Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E.coli* O157:H7

- ,*Salmonella tyPhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*; 18: 414-420.
- Pol I.E, Mastwijk H.C, Slump R.A, Popa M.E and Smid E.J. 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *Journal of Food Protection* ;64 (7): 1012– 1018.
- Puertas-Mejia M .HS, Stashenko E and Winterhalter P. 2002. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flav Frag J*;17(5):380-4.
- Rassoli I, Mirmostafa SA. 2003. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* Boiss and *Thymus persicus* L. *J. Aryric. Food Chem*; 51: 2200 -2205.
- Razavilar v, *Microbial pathogens in foods and epidemiology of food borne intoxication*. 2002. 1nd ed. Tehran: Tehran university press.(in Persian)
- Razavilar V, Akhoundzadeh Basti A, Abbasifar R, Radmehr B. 2006. Effect of *zataria multiflora* boiss essential oil, acetic acid, temperature and storage time on probable growth of *salmonella tyPhimurium* in Brain heart infusion broth *Journal of veterinary research*. 61(2):135-141.
- Reiter M, Rupp K, Baumeister P, Zieger S and Harreus U. 2009. Antioxidant effects of querection and coenzyme Q10 in mini organ cultures of human nasal mucosal cells. *Anticancer Reaserch*; 29: 33-40.
- Rojhan M.1999. *Treatment by medicinal plants*. 1998. Tehran. Markaze farhangi ABA. (in persian)

- Roller S and Seedhar P. 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4 jC and 8 jC. Letters in Applied Microbiology; 35: 390 – 394.
- Saber Navaii M. 2010. Phytochemistry studay of *Thymus kotschyanus* Boiss.et Hohen and Its effect on the symptoms of Irritable Bowel Syndrome. Thesis Submitted for the degree of Professional Doctorate in Pharmcy, Islamic Azad University Pharmaceutical Sciences Branch (in Persian).
- Sadeghian I, Hassanshahian M, Sadeghian S and Jamali SH. 2012. Antimicrobial Effects of *Quercus Brantii* Fruits on Bacterial Pathogens. Jundishapur J Microbiol; 5(3):465-469.
- Sefidkon F and Rahimi Bidgoli A. 2002. Quantitative and qualitative variation assessment of *Thymus kotschyanus* essence in plant growth duration and using several instillation methods. Journal of Medicinal and Aromatics Plant Research; 15(0):1-22.
- Seneirathne M, Kim S.H, Siriwardhana N, Ha J.H, Lee K.W and Joen Y.J. (2006). Antioxidant potential of ecklonia cava on reactive oxygen species acavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. Food Science; 27:758-62.
- Senji S and Yuuya I. 2008. Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegar in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates. Food Chemistry; 107(2): 739-744.
- Simsek B, Sagdic, O. and Ozcelik, S. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the storage of Ayran produced with different spices. Food Engineering;78:676-80.

- Sing Y.Y. (2007). Determination of synthetic Phenolic antioxidant in food items using HPLC and total antioxidants using fia approaches. Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science; 20-30.
- Singh N and Singh R.K. 2002. Efficant of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against E.coli O157: H7 on lettce. Food microbiology; 19: 183-193
- Singh N, Singh R.K, Bhunia A.K and Stroshine R.L. 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing Escherichia coli O157:H7 on lettuce and baby carrots. Leben smittel wissench aften and Technologien; 35: 720–729.
- Skandamis P.N and Nychas G.J.E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and Physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmosPheres. Journal of Applied Microbiology; 91, 1011 –1022.
- Tyagi A.K and Malik A. 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour Phase against food spoilage microorganisms. Food Chemistry; 126: 228–235
- Tassou C, Drosinos E.H and Nychas, G.J.E. 1995. Effects of essential oil from mint (Mentha piperita) on Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 4 jC and 10 jC. Journal of Applied Bacteriology; 78: 593– 600.
- Ultee A, Slump R.A, Steging G and Smid E.J. 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward Bacillus cereus on rice. Journal of Food Protection; 63 (5): 620–624.
- Ultee A and Smid E.J. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by Bacillus cereus. Int J Food Microbiol; 20;64(3):373-8.

- Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I and Wozniak L.A. 2010. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr Med Chem*; 17(28): 3262-3288.
- Zargari A. *Pharmaceutical plants*. 2nd ed., Tehran: Amir Kabir Publications. 1988; pp: 563-5 (in Persian).
- Zhang H, Chen F, Wang X and Yao H. 2006. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Research Int*; 39: 833-9.
- Zhang J, Yuan K and Zhou WL. Studies on the active components and antioxidant of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. 2011. From southern China. *Pharmacogn Mag* ; 7(25): 35-39.
- Zhang Y, Yang L, Zu Y, Chen X, Wang F and Liu F. 2010. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*; 118:656-662.

Abstract

Background: Essential oils and herbal extracts from medicinal plants as a source of natural antioxidants, antimicrobial, anticancer and biologically active compounds have attracted a great deal of interesting applications in fresh and processed food preservation, Pharmaceuticals, alternative medicine and natural-based therapies.

Objective: Determine of chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Thymus Kotschyanus* essential oil in vitro and food model.

Methods: the chemical compositions and its value of *Thymus kotschyanus* were determined with set Gas chromatography-Mass specterometry. Phenolic and Flavonoid component of essential oil were evaluated by using of Standard Methods and Antioxidant activity was evaluated through DPPH assay. Then organoleptic properties, microbial and Physico-chemical quality of Doogh sample prepared with adding different concentration *Thymus kotschyanus* essential oil were investigated during 14 day storage.

Results: Results of essential oil analysis indicated that Thymol (51.1%) was the major compound. Phenolic component scale was $82 \pm 6.43 \mu\text{g/mL}$ and its Flavonoid content was $30.79 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$. This essential oil was able to reduce the stable free radical DPPH with an IC_{50} of $32.35 \mu\text{g/mL}$ and the MIC that determined by the micro dilution method was $470 \mu\text{g/mL}$. Essential oils have potent antimicrobial properties and low concentrations added to the doogh in the early days of the bacterium *E.coli* O157: H7 were destroyed. Based on the results, Physico-chemical properties of Doogh in the presence of oil in that does not cause significant changes except in the case of solids, which Doogh contain 100 and 200 ppm the essential oil Compared with Doogh without the essential oil have a significant difference about this property together.

Conclusions: According to the results of the Doogh can be produced at low concentrations essential oil of *Thymus kotschyanus* and for use in other industries to be more research done on it. This essential oil has a high potential of antioxidant properties. Therefore, it can be suggested to combine this essential oil with other agents for the preservation of foods against oxidative system.

Keywords: essential oil, *Thymus Kotschyanus*, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Doogh



**Qazvin university of Medical Sciences
Faculty of Health**

**Thesis Submitted for the degree of M.Sc. in
Food Safety and Hygiene**

Title:

**Evaluation of chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of
Thymus Kotschyanus essential oil in vitro and Doogh food model**

Supervisor:

Dr. Peyman Qajarbeygi

Adviser:

Dr. Razzagh Mahmoudi

Dr. Asghar Mohammad Poorasl

By:

Foad Mahmoudzadeh

Nov - 2014